

**INDUKTION ZYTOTOXISCHER T-LYMPHOZYTEN
BEIM HAUSHUHN**

JOHANN TRAINER

1988

Disbui. München



Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. U. Lösch

INDUKTION ZYTOTOXISCHER
T-LYMPHOZYTEN BEIM HAUSHUHN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Johann Trainer
aus
Schliersee

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät

der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. J. Kösters

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	7
2.1	Tiere	7
2.1.1	Immunisierung mit allogenen Blutzellen	7
2.1.2	Immunisierung mit Newcastle Disease Virus (NDV)	8
2.2	Medien und Zusätze, Reagenzien	9
2.3	Präparationsmaterial	12
2.4	Geräte	12
2.5	Immunisierung	12
2.5.1	Immunisierung mit allogenen Blutzellen	12
2.5.2	Immunisierung mit Newcastle Disease Virus (NDV)	14
2.6	Gewinnung und Überprüfung von Antithymus- zellserum (ATS), Antibursazellserum (ABS) und Komplement	15
2.6.1	ATS und ABS	15
2.6.2	Komplement	18
2.6.3	Überprüfung von ATS, ABS und Komplement	19
2.6.3.1	Wirksamkeit und Toxizität der einzelnen komplementhaltigen Seren	19
2.6.3.2	Wirksamkeit und Spezifität des ATS	19
2.7	Auswertung	20
2.7.1	Zellvermittelte Immunreaktion gegen Alloantigene	20
2.7.1.1	Zielzellen	20
2.7.1.2	Effektorzellen	21
2.7.1.3	^{51}Cr -Release-Assay	22
2.7.1.4	Behandlung der Effektorzellen	23
2.7.2	Virusinduzierte zellvermittelte Immunität	27
2.7.2.1	Zielzellen	27
2.7.2.2	Effektorzellen	31
2.7.2.3	^{51}Cr -Release-Assay	31
3.	Ergebnisse	32
3.1	Vorversuche	32
3.1.1	Wirksamkeit und unspezifische Toxizität der einzelnen komplementhaltigen Seren	32
3.1.2	Wirksamkeit und Spezifität des Antithymuszellserums (ATS)	33
3.1.3	Erythrozyten als Zielzellen im ^{51}Cr -Release-Assay	34
3.1.4	NDV-infizierte Hühnerembryofibroblasten als Zielzellen im ^{51}Cr -Release-Assay	36
3.1.4.1	Kontrolle der NDV-Infektion	36
3.1.4.2	Verschiedene Bedingungen während der Markierung	38
3.1.5	Auswirkung der neonatalen Cyclophosphamidbehandlung	38

3.2	Zellvermittelte Zytotoxizität gegen Alloantigene	39
3.2.1	Induzierung einer zellvermittelten Immunantwort	39
3.2.2	Spezifität der zellvermittelten Immunantwort	40
3.2.3	Einfluß der verschiedenen Fraktionierungs- methoden auf die zytotoxische Aktivität	48
3.2.3.1	Zytotoxizität nach Eliminierung plastikadhärenter Zellen	49
3.2.3.2	Zytotoxizität nach Eliminierung phagozytischer Zellen mit Karbonylseifen	50
3.2.3.3	Zytotoxizität nach Adsorption an mit Antikörpern beschichtete Petrischalen	51
3.2.3.4	Zytotoxizität nach ATS-Komplement-Behandlung	52
3.2.3.5	Zytotoxizität nach Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper (mab) TCR2	53
3.3	Zellvermittelte Immunreaktion nach Immunisierung mit NDV	55
3.3.1	Reaktion nach primärer Immunisierung	55
3.3.2	Reaktion nach sekundärer Immunisierung	56
4.	Diskussion	59
4.1	Zellvermittelte Immunreaktion gegen Alloantigene	59
4.2	Zellvermittelte Immunreaktion gegen NDV	66
5.	Zusammenfassung	69
6.	Summary	70
7.	Literaturverzeichnis	71

Abkürzungsverzeichnis

ABS bzw. ATS	Antibursa- bzw. Antithymuszellserum
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
CTL	cytotoxic T lymphocyte
E/T-Ratio	Effektor-Zielzellverhältnis
FCS	fetal calf serum
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEF	Hühnerembryofibroblasten
IgG bzw. IgM	Immunglobuline der Klasse G bzw. M
i. v.	intravenös
mab	monoclonal antibody
NDV	Newcastle disease virus
NK	natural killer
PBS	phosphate-buffered saline
SR	spontaneous release
TR	total release

Die zellvermittelte Immunität stellt neben der humoralen eine der beiden grundsätzlichen Formen der spezifischen Immunreaktionen dar, zu denen höhere Wirbeltiere in der Lage sind.

Während die humorale Abwehr ihre zelluläre Grundlage in bursaabhängigen Zellen - B-Lymphozyten - besitzt, welche lösliche Immunglobuline bilden und freisetzen, sind für die zellvermittelte Immunität Zellen verantwortlich, die während ihrer Reifung den Thymus durchlaufen.

Bei diesen T-Zellen handelt es sich um eine bezüglich ihrer Funktion heterogene Zellpopulation, welche durch vielfache Wechselbeziehungen zum humoralen und zellvermittelten Immunsystem einerseits, zu unspezifischen Komponenten (Makrophagen, polymorphkernige Leukozyten) andererseits, eine entscheidende Rolle in der Regulation der Immunantwort spielt. Man unterscheidet in diesem Zusammenhang T-Helfer- und T-Suppressor-Zellen, und es gibt deutliche Hinweise darauf, daß sich diese wie die dritte Gruppe, die zytotoxischen T-Lymphozyten, wiederum in verschiedene Subpopulationen auffächern (MIZUOCHI et al., 1986; LANIER und PHILLIPS, 1986).

Zytotoxizität ist neben unspezifischen Mechanismen und spezifischen humoralen Mediatoren wesentlich von lymphoiden Zellen abhängig, welche allein (CTL - zytotoxische T-Lymphozyten, NK - natural killer cells) oder im Zusammenspiel mit humoralen Antikörpern (ADCC - antibody-dependent cellular cytotoxicity) ihre Wirkung entfalten.

NK-Aktivität, d. h. Auftreten von zytotoxisch aktiven Zellen ohne vorherigen Antigenkontakt scheint eine Rolle in der Abwehr von Tumorzellen zu spielen und wurde auch beim Huhn nachgewiesen (SHARMA und COULSON, 1979; FLEISCHER, 1980).

Auch bei ADCC ist eine Sensibilisierung der Effektorzellen nicht gegeben; allerdings ist die Anwesenheit spezifischer Antikörper notwendig, welche eine spezifisch gegen antigentragende Zielzellen gerichtete Lysis durch primär inaktive lymphoide Effektorzellen vermitteln. ADCC wurde auch beim Huhn festgestellt (FLEISCHER, 1980; CHI und THORBECKE, 1981 b).

Die spezifische zellvermittelte Zytotoxizität (SCMC) hat ihre zelluläre Grundlage in zytotoxischen T-Lymphozyten und spielt eine entscheidende Rolle bei Transplantatabstoßungsreaktion, Graft-versus-host-Reaktion sowie in der immunologischen Überwachung von virusinfizierten Zellen.

SCMC wird durch ein- oder mehrmaligen Antigenkontakt induziert, ist spezifisch gegen das betreffende Antigen gerichtet und vom Haupthistokompatibilitätskomplex (beim Huhn der B-Locus) abhängig.

Die meisten Arbeiten über zellvermittelte Immunität beim Huhn befassen sich mit der Reaktion gegen Tumorantigene, vor allem im Zusammenhang mit der Marekschen Krankheit (POWELL und ROWELL, 1977; SHARMA et al., 1978; SCHAT und MURTHY, 1980), Retikuloendotheliose (MACCUBBIN und SCHIERMANN, 1986) und Rous Sarkom (MCGRAIL et al., 1978).

Zytotoxizität gegen virale Antigene wurde von verschiedenen Autoren beschrieben, und zwar gegen das Marek-Virus (KODAMA et al., 1979), gegen aviäre RNA-Viren (KURTH und BAUER, 1972) und gegen das Newcastle-Disease-Virus (CANNON und RUSSELL, zur Veröffentlichung eingesandt).

RONNLUND und LINNA (1978) konnten hohe zytotoxische Aktivität von Milzzellen immunisierter Hühner gegen allogene Erythrozyten demonstrieren. Weitergehende Experimente zeigten, daß diese bei immunologisch intakten Tieren vorwiegend durch Makrophagen verursacht zu werden scheint (PALLADINO et al., 1980), während bei agammaglobulinämischen Hühnern hauptsächlich zytotoxische T-Lymphozyten eine Rolle spielen (CHI et al., 1981 a); auch ADCC gegen allogene Erythrozyten konnte nachgewiesen werden (RONNLUND und LINNA, 1980; CHI und THORBECKE, 1981 b).

Das am häufigsten benutzte Verfahren zum in vitro-Nachweis von Zytotoxizität ist der 51-Chrom-Freisetzungstest (im Folgenden als ^{51}Cr -Release-Assay bezeichnet), welcher auch bei Studien am Huhn Verwendung findet. Die Methode beruht auf der Tatsache, daß radioaktives ^{51}Cr als Natriumchromat von lebenden Zellen aufgenommen und an Plasmaproteine gebunden wird. Beim Absterben der Zellen wird es in löslicher Form wieder freigesetzt; die nicht zellgebundene ^{51}Cr -Aktivität ist somit ein Maß für die Anzahl lysierter Zellen.

Als Effektorzellen im ^{51}Cr -Release-Assay werden vor allem Milzzellen eingesetzt, wobei durch verschiedene Fraktionierungsmethoden versucht wird, die für die Zytotoxizität verantwortliche Zellpopulation zu ermitteln.

Anders als bei Milzzellsuspensionen vom Säuger scheint im aviären System die Abtrennung von Erythrozyten über Ficoll- oder Percoll-Gradienten notwendig zu sein (CHI et al., 1981 a), um Proportionalität zwischen Effektor-Zielzellverhältnis und erreichter Zytotoxizität zu finden.

Weitere Fraktionierung ermöglicht die Ausschaltung bzw. Selektion bestimmter Leukozytenpopulationen.



Durch Adhärenz an Plastikoberflächen können Makrophagen eliminiert werden (PALLADINO et al., 1980).

Inkubation mit Eisen- oder Karbonyleisenpulver bewirkt eine Depletion phagozytischer und adhärerender Zellen nach Entfernung der Eisenpartikel mit einem Magneten (GOLSTEIN und BLOMGREN, 1973; LEE, 1980).

Die Adsorption an mit Anti-Maus-Immunglobulin beschichteten Plastikoberflächen ermöglicht die Depletion von oberflächenimmunglobulintragenden Zellen in der effluenten Fraktion bei Maus-Lymphozyten (MAGE et al., 1976; WYSOCKI und SATO, 1978). Im hiesigen Labor wurde diese Methode modifiziert (CIHAK et al., zur Veröffentlichung eingereicht) und zur Trennung von peripheren Blutlymphozyten und Milzlymphozyten vom Huhn benutzt, wobei die Fraktionierung auf Petrischalen stattfindet, die mit Anti-Huhn-IgG vom Kaninchen beschichtet sind.

Durch diese Adsorption werden oberflächenimmunglobulin-exprimierende Zellen (B-Lymphozyten) aus der Suspension entfernt.

Heterologe Antiseren gegen Hühner-T- bzw. -B-Zellen wurden von verschiedenen Autoren beschrieben (IVANYI und LYDYARD, 1972; WICK et al., 1973; ISAKOVIC et al., 1975; BOYD und WARD, 1978). Solche polyklonalen Antiseren können in Gegenwart von Komplement T- bzw. B-Zellen ausschalten und damit die für die Zytotoxizität verantwortliche Zellpopulation charakterisieren. Im Gegensatz zu den oben angeführten Methoden lassen sich hiermit selektiv CTL als Effektorzellen nachweisen.

Eine andere Möglichkeit zu zeigen, daß T-Lymphozyten zytotoxische Aktivität aufweisen, könnte im Einsatz monoklonaler Antikörper bestehen, welche spezifisch mit T-Lymphozyten reagieren.

Bei Experimenten mit monoklonalen Antikörpern, die gegen menschliche T-Lymphozyten gerichtet sind (LANDEGREN et al., 1982; MEUER et al., 1986) gelang es, zellvermittelte Zytolyse zu blockieren.

Im hiesigen Labor wurde ein monoklonaler Antikörper - TCR2 - hergestellt und charakterisiert, welcher den α/β -T-Zellrezeptor beim Huhn erkennt (CIHAK et al., zur Veröffentlichung eingesandt, CHEN et al., zur Veröffentlichung eingesandt), und es liegt nahe, den Einfluß dieses Antikörpers auf CTL zu überprüfen.

Wie eingangs angesprochen, bestehen zwischen humoralen und zellulären Mechanismen enge Wechselbeziehungen, so daß - wie auch umgekehrt - die zellvermittelte Immunreaktion immer von der Reaktion des humoralen Immunsystems beeinflusst wird. Diese Einflüsse können durch eine teilweise oder vollständige Suppression der Bursa-funktion ausgeschaltet oder wenigstens gemindert werden, was einerseits zur besseren Überschaubarkeit bei Experimenten und besseren Interpretierbarkeit der Ergebnisse führt, andererseits auch die CTL-Aktivität steigern kann (CHI et al., 1981 a; MACCUBBIN und SCHIERMANN, 1986).

Eine Suppression des humoralen Abwehrsystems läßt sich zunächst durch chirurgische oder hormonelle (Behandlung der bebrüteten Eier mit Testosteronpropionat) Bursektomie erreichen, wodurch eine Hypo- bzw. Dysgammaglobulinämie mit unterschiedlicher Erholungstendenz erzeugt wird. Durch Applikation von Cyclophosphamid kurz nach dem Schlupf entsteht eine weitaus deutlicher ausgeprägte, auch länger anhaltende Hypogammaglobulinämie. Die Kombination beider Verfahren (Bursektomie und Cyclophosphamidbehandlung) ist im Hinblick auf Grad und Dauer der Immunsuppression am wirksamsten (FIEDLER et al., 1977).

Aufgabenstellung:

Ziel der Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln, mit dem sich zellvermittelte Zytotoxizität beim Huhn hervorrufen und nachweisen läßt.

Hierbei ging es zunächst darum, eine geeignete Nachweismethode zu finden und zu optimieren, welche den Besonderheiten im aviären System Rechnung trägt, zum anderen darum, die Bedeutung der zytotoxischen T-Lymphozyten in diesem System zu bestätigen. Schließlich könnte die Verfügbarkeit eines solchen Modells einen wichtigen Beitrag zur Charakterisierung neuer T-zellspezifischer monoklonaler Antikörper liefern.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tiere

2.1.1 Immunisierung mit allogenen Blutzellen

Hierfür fanden als Empfängertiere ingezüchtete Weiße Leghornhühner der Linie RPRL6 beiderlei Geschlechts Verwendung, die bezüglich des B-Haplotyps einheitlich B²/B² aufweisen. Diese Tiere amerikanischen Ursprungs werden am Institut für Kleintierzucht der Forschungsanstalt für Landwirtschaft in Celle, Bundesrepublik Deutschland, gehalten, und es standen Bruteier zur Verfügung, welche hier im Hause ausgebrütet wurden. Bei Versuchsbeginn (Beginn der Immunisierung) waren die Tiere 10 bis 11 Wochen alt. Die Haltung erfolgte in kleinen Gruppen auf Gitterrosten, wobei handelsübliches Küken- bzw. Jung-hennenalleinfutter und Trinkwasser zur freien Aufnahme zur Verfügung standen. Bei einer Tiergruppe wurde mit dem Trinkwasser zusätzlich ein Tetracyclin-Vitamin-Konzentrat (Terramycin-Hen, Pfizer) statt des sonst üblichen Vitaminzusatzes verabreicht; diese Gruppe war zudem am ersten Lebenstag mit TAD Marek vac L, einem Putenherpesvirus-Lebendimpfstoff, gegen die Marek'sche Krankheit geimpft worden.

Als Spender für allogene Blutzellen dienten ebenfalls Weiße Leghornhühner, und zwar zwei weibliche Tiere des B-Haplotyps B⁰/B⁰ (Obese strain) und je ein männliches und ein weibliches Tier des B-Haplotyps B¹²/B¹² (FP strain). Diese Tiere, ebenfalls amerikanischen Ursprungs, stammen aus dem Institut für Allgemeine und Experimentelle Pathologie der Universität Innsbruck, Österreich. Sie fanden ab dem Alter von etwa 6 Wochen Verwendung als Spendertiere.

Cyclophosphamidbehandlung

Ein Teil der mit allogenen Blutzellen immunisierten Tiere war neonatal in Anlehnung an MACCUBBIN und SCHIERMAN, 1986 mit Cyclophosphamid behandelt worden. Hierzu wurde Cyclostin-Trockensubstanz (Farmitalia) verwendet, welche mit aqua pro injectione in einer Konzentration von 20 mg/ml aufgelöst wurde. Die Küken erhielten jeweils am ersten und zweiten, teilweise auch am dritten Lebenstag 0,2 ml dieser Lösung intraperitoneal, d. h. zwei- bis dreimal 4 mg Cyclophosphamid. Von diesen Tieren wurden im Alter von 12 Wochen (Beginn der Immunisierungen) sowie jeweils bei der Milzentnahme Serumproben gewonnen, indem man Nativblut 45 Minuten bei 39°C, daran anschließend über Nacht bei 4°C inkubierte. Das sich abscheidende Serum wurde abgenommen und durch Zentrifugation von Resten des Blutkuchens gereinigt. Die einzelnen Seren wurden mittels der Immunelektrophorese nach SCHEIDEGGER, 1955, auf ihre Immunglobulingehalte (IgG und IgM) hin untersucht.

2.1.2 Immunisierung mit Newcastle Disease Virus (NDV)

Hierzu wurden erwachsene Hühner beiderlei Geschlechts verwendet, und zwar Tiere der Linie RPRI.6 (B-Haplotyp B²/B²) und der hier im Hause gehaltenen UM B19-Linie (B-Haplotyp B^{1*}/B^{1*}). Um eine Verbreitung des verabreichten vermehrungsfähigen Virusstamms La Sota zu vermeiden, wurden diese Tiere in Gruppen bis zu 4 Tieren in unterdruckbelüfteten Isolatoren gehalten, wobei wieder Junghennenalleinfutter und Trinkwasser ad libitum zur Verfügung standen. Vor Beginn der Immunisierung wurden sie in kleinen Gruppen auf Gitterrosten gehalten, wobei ebenfalls Futter und Trinkwasser zur freien Aufnahme zur Verfügung stand.

2.2 Medien und Zusätze, Reagenzien

- RPMI 1640 ohne Glutamin mit NaHCO_3 (Flow Laboratories)
- RPMI 1640 ohne Glutamin mit HEPES (Flow Laboratories)
- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Flow Laboratories)
Die zehnfach konzentrierte Lösung wurde mit sterilem bidestillierten Wasser 1:10 verdünnt.
- PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

8,0 g NaCl
0,2 g KCl
1,442 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0,2 g KH_2PO_4
Aqua bidest. ad 1000,0 ml

Einstellung auf pH 7,4 mit 5 n HCl

Die fertige Lösung wurde sterilfiltriert (0,42 nm Porengröße).

- Physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl in aqua bidest, sterilfiltriert)
- FCS (Fetales Kälberserum, Flow Laboratories)
- L-Glutamin, 200 mM (Seromed)
- Penicillin-Streptomycin-Lösung (Seromed)
10.000 I.E. Penicillin/ml, 10.000 μg Streptomycin/ml
- Hank's Lactalbumin (Flow Laboratories)

- Trypsin 0,25 % (Flow Laboratories)
Die 2,5 %ige Trypsinlösung wurde mit HBSS 1:10 verdünnt.
- Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals)
- Mitomycin 2 medac (medac)
- Trypanblau (0,5 % in physiologischer Kochsalzlösung, Seromed)
- FCA (Freund's komplettes Adjuvans, Difco)
- Liquemin 5000 (Hoffmann - La Roche)
Eine Ampulle (0,5 ml mit 5000 IE Natriumheparinat) wurde jeweils in 9,5 ml RPMI 1640 aufgelöst (Verdünnung 1:20).
- Extran (Merck)
- ^{51}Cr als Natriumchromat in isotonischer Kochsalzlösung (Amersham Buchler)
Spezifische Aktivität 11,1 - 18,5 GBq (300 - 500 mCi)/mg Chrom;
2 ml Lösung besitzen zum Kalibrierungszeitpunkt eine Aktivität von 37 MBq (1 mCi)
- Anti-NDV-Fluoreszeinisothiozyanat-Konjugat (dankenswerterweise von Frau Dr. Weßling, Tiergesundheitsdienst Grub, zur Verfügung gestellt)
- Karbonyleisensuspension ("Lymphocyte Separator Reagent", Technicon)
- K3I (ein am Institut von Kaninchen gewonnenes und affinitätschromatographisch gereinigtes Antiserum gegen Huhn-IgG; SCHRANNER und LÖSCH, 1986)
- Bovines Immunglobulin (Behringwerke)

- Monoklonale Antikörper
(mab; CIHAK et al., zur Veröffentlichung eingesandt)

- . 6-24: TCR2-haltiger Hybridoma-Kulturüberstand
- . 6-27: TCR2-Aaszites, über eine Sepharose-Protein-A-Säule gereinigt; 100 µg IgG/ml.
- . Kontrollantikörper:
16-N: Hybridoma-Kulturüberstand, enthält einen mab, der mit peripheren mononukleären Blutzellen, T-Lymphoblasten, Erythroblasten und Makrophagen vom Huhn reagiert.
- T_{10A8}: Über Sepharose-Protein-A gereinigter Aaszites, enthält einen mab, der eine Subpopulation von peripheren Hühner-T-Lymphozyten erkennt; 100 µg IgG/ml.

- "Medium": Penicillin-Streptomycin 1 ml
L-Glutamin 1 ml
FCS 10 ml
RPMI 1640 ad 100 ml

- "Zellkulturwachstumsmedium":
Penicillin-Streptomycin 1 ml
L-Glutamin 1 ml
FCS 5 ml
Hank's Lactalbumin 10 ml
RPMI 1640 ad 100 ml

- "Zellkulturerhaltungsmedium":
Penicillin-Streptomycin 1 ml
L-Glutamin 1 ml
FCS 1,5 ml
Hank's Lactalbumin 10 ml
RPMI 1640 ad 100 ml

2.3 Präparationsmaterial

- Petrischalen, Durchmesser 60 und 100 mm (Nunclon)
- Gewebekulturflaschen 50 ml (Falcon Plastics)
- Sterile Plastikröhrchen 13 ml (Falcon Plastics)
- Zellkultur-Mikrotiterplatten, 96 Löcher, F-Form (Nunclon)

2.4 Geräte

- Zentrifuge: Damon JEC Division
JEC PR-J Centrifuge
- Brutschrank: Heraeus,
eingestellt auf 39°C und 5 % CO₂
- Gamma-Zähler: Packard Auto-Gamma 500
(United Technologies)

2.5 Immunisierung

2.5.1 Immunisierung mit allogenen Blutzellen

Die Immunisierung mit allogenen Blutzellen erfolgte in Anlehnung an PALLADINO et al., 1980; CHI et al., 1981 a und CHI und THORBECKE, 1981 b.

Blutentnahme

Die Blutentnahme bei den B12- bzw. in einigen Fällen bei den B5-Tieren erfolgte aus der V. jugularis unter weitgehend sterilen Bedingungen. Dazu wurde nach Desinfektion und Befeuchten des Areals mit 70 %igem Alkohol die Vene mit aufgesetzter Spritze punktiert und Blut aspiriert. Die 10-ml-Spritze war, je nach der Menge des zu entnehmenden Blutes, mit 0,1 bis 0,5 ml Liquemin 5000 (Verdünnung 1:20 in RPMI 1640) beschickt.

Präparation der Blutzellen

Das gewonnene Blut (jeweils 3 ml bis 10 ml) wurde 1:2 mit HBSS verdünnt und auf 10 ml Ficoll-Paque geschichtet. Nach 40-minütiger Zentrifugation mit 400 g bei 18°C wurde der Leukozytensaum mit einer Pasteurpipette abgenommen und in einem anderen Röhrchen resuspendiert. Das verbleibende Erythrozytenpellet wurde in HBSS resuspendiert und sowohl Leukozyten als auch Erythrozyten durch dreimaliges Zentrifugieren bei 300 g für jeweils 10 Minuten gewaschen (BOYUM, 1968). Das Erythrozytenpellet wurde in der vierfachen Menge HBSS aufgenommen und so eine 20 %ige Suspension hergestellt. Das Leukozyten-Pellet wurde in dieser 20 %igen Erythrozyten-Suspension aufgenommen, wobei jeweils die Leukozyten aus 3 ml Blut in 1 ml Erythrozyten-Suspension aufgeschwemmt wurden.

In mehreren Ansätzen wurde die Anzahl der Leukozyten nach Trypanblaufärbung mittels der NEUBAUERschen Zählkammer festgestellt. Dabei ergaben sich Werte von etwa 1×10^6 Zellen je 3 ml Blut, der jeweils an ein Huhn verabreichten Dosis ($0,3$ bis $0,35 \times 10^6$ /ml Blut).

Verabreichung der allo genen Blutzellen

Zur Immunisierung wurde in wöchentlichen Abständen 1 ml der 20 %igen Erythrozytensuspension in die Flügelvene (V. cutanea ulnaris) injiziert. Nach mehrmaliger Immunisierung mit Erythrozyten wurde eine Suspension verabreicht, die neben den Erythrozyten angereichert Leukozyten enthielt. Dabei wurden jeweils alle Leukozyten aus 3 ml Blut (ca. 1×10^6 Zellen) für die Immunisierung eines Huhns verwendet. Diese leukozytenangereicherte Suspension wurde eine Woche nach der letzten Erythrozyten-Immunisierung gegeben.

Nach 3 bis 9 (meistens 4 - 6) Immunisierungen wurden die Tiere am 3. bis 5. Tag nach der letzten Immunisierung getötet und die Milzen zur Untersuchung entnommen.

Drei Tiere wurden am achten, zehnten beziehungsweise zwölften Tag nach primärer Immunisierung mit jeweils 1 ml der leukozytenangereicherten Erythrozytensuspension auf zytotoxische Aktivität untersucht. Hierbei waren nach der Ficoll-Zentrifugation die Lymphozyten 30 Minuten bei 37°C mit Mitomycin (50 µg/ml) inkubiert und dann dreimal gewaschen worden.

2.5.2 Immunisierung mit NDV

Zur Immunisierung wurde der handelsübliche Impfstoff Sotavax (Vemie) verwendet, ein Lebendimpfstoff, welcher den lentogenen NDV-Stamm La Sota enthält und kommerziell in einer Dosierung von 10^6 EID₅₀ bei oraler Verabreichung Anwendung findet.

Die lyophilisierte Vakzine wurde in RPMI 1640 aufgelöst, verdünnt und sofort entweder auf intravenösem Wege oder über die Schleimhäute appliziert. Die intravenöse Immunisierung mit Virusdosen von 1×10^3 EID₅₀ bis 1×10^6 EID₅₀ wurde an der Flügelvene (V. cutanea ulnaris) durchgeführt. Die Verabreichung über die Schleimhäute erfolgte jeweils zur Hälfte konjunktival und intranasal in Dosen von 2×10^5 EID₅₀ bis 2×10^7 EID₅₀.

8 und 10 Tage nach der Immunisierung wurden die Tiere getötet und die Milzen zur weiteren Untersuchung entnommen.

Bei einer Gruppe wurde am 13. Tag nach der primären Immunisierung (konjunktival und intranasal mit 2×10^4 EID₅₀ bis 2×10^6 EID₅₀) eine sekundäre Immunisierung mit 2×10^6 EID₅₀ konjunktival und intranasal vorgenommen und die Milzen am 3. bzw. 5. Tag nach der letzten Verabreichung entnommen.

Kontrolle der NDV-Infektion in vivo

Beim Tiergesundheitsdienst in Grub wurden die Seren von vier zufällig ausgewählten, nicht immunisierten Tieren des Bestandes sowie die Seren von zwei intravenös mit NDV (La Sota) infizierten Tieren (Blutentnahme 22 Tage nach der Inokulation) mittels des Hämagglutinations-Hemmungstests auf NDV-Antikörper untersucht. Die beiden infizierten Tiere wiesen Titer von 1:16 bzw. 1:8 auf, während bei den anderen keine Antikörper nachweisbar waren.

2.6 Gewinnung und Überprüfung von Antithymuszellserum (ATS), Antibursazellserum (ABS) und Komplement

2.6.1 ATS und ABS

Die Herstellung dieser Seren wurde in Anlehnung an die Arbeiten verschiedener Autoren vorgenommen (IVANYI und LYDYARD, 1972; WICK et al., 1973; ISAKOVIC et al., 1975; BOYD und WARD, 1978). Es wurden Kaninchen wiederholt mit Thymus- bzw. Bursazellsuspensionen immunisiert, die Seren gewonnen und kreuzabsorbiert.

Zellsuspensionen

Als Thymus- und Bursaspender dienten 2 bis 3 Wochen alte, nicht B-typisierte männliche Weiße Leghornküken (LSL). Nach Töten der Tiere wurden die Organe entnommen und sofort in 100-mm-Petrischalen gegeben, die auf Eis gebettet waren und PBS enthielten. Nach Spülen der Organe und Überführen in frische Petrischalen - ebenfalls mit PBS auf Eis - wurden sie mit zwei Hakenpinzetten zerzupft, nachdem Bindegewebsanteile und Blutgerinnsel so gut wie möglich entfernt worden waren. Die zerkleinerten Organe wurden dann durch ein Stahlnetz (Maschenweite 0,75 x 0,75 mm) gedrückt und die entstehende Einzelzellsuspension mit Pasteurpipetten in 13-ml-Plastikröhrchen überführt. Durch 10minütiges Stehenlassen auf Eis setzten

sich größere Zellverbände ab; der Überstand wurde dann abgenommen und 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde durch zweimaliges Zentrifugieren in jeweils 10 ml PBS (10 Minuten bei 300 g) gewaschen und nach Bestimmung der Anzahl lebender Zellen mittels Trypanblaufärbung und NEUBAUERscher Zählkammer mit PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

Immunisierung

Es wurde jeweils ein erwachsenes männliches Belgierkaninchen mit Thymus- bzw. Bursazellen immunisiert.

Thymuszellen: $2,1 \times 10^9$ Thymuszellen in 1,5 ml PBS wurden als Suspension mit dem gleichen Volumen Freund's komplettes Adjuvans (FCA) verabreicht, wobei die Injektion intramuskulär und subkutan auf mehrere Stellen verteilt vorgenommen wurde (Kaninchen Nr. 234).

Bursazellen: $1,5 \times 10^9$ Bursazellen wurden in 1 ml PBS verabreicht, wieder als Suspension mit FCA intramuskulär und subkutan auf mehrere Stellen verteilt (Kaninchen Nr. 123).

6 Wochen nach der primären Immunisierung wurden an Kaninchen Nr. 234 $3,0 \times 10^9$ Thymuszellen (in 5 ml PBS), an Kaninchen Nr. 123 $0,7 \times 10^9$ Bursazellen (in 3 ml PBS) intravenös (Ohrvene) verabreicht.

3 Wochen nach der sekundären Immunisierung wurden an Kaninchen Nr. 234 $2,8 \times 10^9$ Thymuszellen (in 5 ml PBS), an Kaninchen Nr. 123 $0,8 \times 10^9$ (in 3 ml PBS) Bursazellen in die Ohrvene verabreicht.

Serumgewinnung

7 Tage nach der tertiären Immunisierung wurden bei beiden Kaninchen durch Punktion der Ohrvenen je etwa 20 ml Blut gewonnen. Dieses wurde in Glasröhrchen mit einem Glasstab für 1 Stunde bei Zimmertemperatur, dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Ablösen des Blutkuchens von der Gefäßwand wurde das Serum abgenommen, 10 Minuten lang bei 1000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Weitere Behandlung der Antiseren

Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Seren bei -20°C aufbewahrt. Zur Inaktivierung von Komplement wurden die Seren für 30 Minuten im Wasserbad bei 56°C gehalten.

Es wurde jeweils viermal absorbiert, wobei ATS mit Bursa-zellen, ABS mit Thymuszellen inkubiert wurde; die Zellsuspensionen wurden wie beschrieben zubereitet.

Erste Absorption: 5 ml ATS bzw. ABS wurden mit 0,8 ml Bursa- bzw. 1,5 ml Thymuszellsediment 2 Stunden bei 4°C inkubiert.

Zweite Absorption: 5 ml ATS bzw. ABS wurden mit 1,3 ml Bursa- bzw. 2,8 ml Thymuszellsediment inkubiert, und zwar 30 Minuten bei Zimmertemperatur, danach 4 Stunden bei 4°C.

Dritte und

vierte Absorption: Jeweils 2 ml ATS bzw. ABS wurden mit 0,8 ml Bursa- bzw. 1,6 ml Thymuszellsediment inkubiert, und zwar zweimal jeweils für 30 Minuten bei Zimmertemperatur und 4 Stunden bei 4°C.

Während der Absorptionen wurden die Zellen alle 15 bis 20 Minuten durch Schütteln resuspendiert. Nach jeder einzelnen Absorption wurden die Seren zunächst durch Zentrifugation bei 300 g von den Zellen getrennt und anschließend durch Zentrifugation bei 1700 g gereinigt.

Die absorbierten Seren wurden in Portionen zu 200 µl abgefüllt und bis zur Verwendung bei -20°C gehalten.

2.6.2 Komplement

Komplementgewinnung

Bei 5 erwachsenen, nicht immunisierten Weißen Neuseeländerkaninchen wurden durch Punktion der Ohrvenen jeweils ca. 5 ml Blut gewonnen, welches in Glasröhrchen mit Glasstab zunächst 1 Stunde bei Zimmertemperatur, dann 3 Stunden bei 4°C inkubiert wurde. Nach Serumabnahme und Zentrifugation (5 Minuten bei 1000 g) wurde die weitere Behandlung im Eiswasserbad vorgenommen.

Absorptionen

5 normogammaglobulinämische Tiere der Linie UM B19 im Alter von 4 - 5 Wochen dienten als Spender für Milz, Thymus und Bursa. Die Organe wurden wie beschrieben zubereitet. Milz-, Thymus- und Bursazellsuspension wurden dann gepoolt, auf 2 x 5 Röhrchen verteilt, abzentrifugiert (10 Minuten bei 300 g) und das Sediment zur Absorption der Kaninchenserum verwendet. Es wurden jeweils etwa 3 Raumteile Serum mit 2 Raumteilen Zellsediment absorbiert, und zwar zweimal nacheinander 30 Minuten lang im Eiswasserbad, wobei die Zellen durch Schütteln der Röhrchen wiederholt resuspendiert wurden. Nach Abzentrifugieren der Zellen (5 Minuten bei 300 g) wurde das Komplement durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 1700 g gereinigt und in Portionen zu 100 µl bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

2.6.3 Überprüfung von ATS, ABS und Komplement

2.6.3.1 Wirksamkeit und Toxizität der einzelnen komplementhaltigen Seren

Zur Überprüfung der einzelnen komplementhaltigen Seren (C1 bis C5) wurde aus der Bursa eines UM B19-Huhns (männlich, normogammaglobulinämisch, 6 Wochen alt) eine Einzelzellsuspension hergestellt, wobei hier statt PBS HBSS mit 10 % FCS verwendet wurde. 50 µl der auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellten Suspension wurde in 1,5-ml-Eppendorf-Cups folgendermaßen inkubiert:

- a) ohne Zusatz
- b) mit ABS allein (Endverdünnung 1:6)
- c) mit den einzelnen Komplement-Ansätzen (Endverdünnung 1:15)
- d) mit ATS und den einzelnen Komplement-Ansätzen in den genannten Verdünnungen.

Das Volumen der einzelnen Ansätze wurde gegebenenfalls mit HBSS + 10 % FCS ausgeglichen. Nach 30minütiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurden die einzelnen Ansätze 1:2 mit Trypanblau verdünnt und die Anzahl der lebenden Zellen mit einer NEUBAUERschen Zählkammer bestimmt.

2.6.3.2 Wirksamkeit und Spezifität des ATS

Zur Überprüfung des ATS wurden Thymus-, Bursa- und Milzzellsuspensionen von 4 - 8 Wochen alten normogammaglobulinämischen UM B19- oder LSL-Hühnern in Medium hergestellt. Die Milzzellsuspension wurde zudem über Ficoll-Paque von Erythrozyten gereinigt. Die Einzelzellsuspensionen wurden auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und davon 100 µl folgendermaßen angesetzt:

- a) ohne Zusatz
- b) mit C4 allein bei Endverdünnungen von 1:4, 1:8 und 1:15
- c) mit ATS allein bei Endverdünnungen von 1:4, 1:8, 1:10 und 1:100 sowie
- d) mit ATS und C4 in den genannten Verdünnungen.

Auch hier wurde gegebenenfalls das Volumen mit Medium ausgeglichen. Die Zellen wurden zunächst für 15 Minuten mit ATS allein bei 37°C im Wasserbad inkubiert, dann Komplement hinzugefügt und weitere 45 Minuten im Wasserbad gehalten. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte nach Verdünnung mit Medium so wie unter 2.6.3.1 beschrieben.

2.7 Auswertung

Zum in vitro-Nachweis der zellvermittelten Zytotoxizität wurde der 51-Chrom-Freisetzungstest (^{51}Cr -Release-Assay) in Anlehnung an BRUNNER et al., 1976 und GRABSTEIN, 1980 eingesetzt.

2.7.1 Zellvermittelte Immunreaktion gegen Alloantigene

2.7.1.1 Zielzellen

Als Zielzellen wurden Erythrozyten von Tieren verwendet, die bezüglich des Haupthistokompatibilitätskomplexes identisch waren mit den Zellen, mit denen immunisiert worden war (B12/B5). Zur Klärung der Spezifität der Effektorzellen wurde gleichzeitig gegen syngenetische Erythrozyten (B2) getestet.

Zubereitung

Aus der Flügelvene wurde eine kleine Menge (ca. 0,5 ml) Heparinblut gewonnen, die Erythrozyten in PBS + 10 % FCS dreimal gewaschen und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. 100 μ l dieser Suspension wurden für 30 Minuten mit 200 μ l Natriumchromatlösung im Brutschrank bei 39°C inkubiert, wobei die Zellen durch Schütteln mehrmals resuspendiert wurden. Anschließend wurden die Erythrozyten durch viermaliges Resuspendieren und jeweils 5minütiges Zentrifugieren bei 300 g in etwa 5 ml Medium gewaschen, dann das Pellet in 10 ml Medium aufgeschwemmt, so daß eine Suspension mit 1×10^6 Zellen/ml entstand.

Vorversuche (zum ^{51}Cr -Release-Assay)

Um die optimalen Bedingungen für die ^{51}Cr -Markierung herauszufinden, wurde die unter 2.7.1.1 beschriebene Methode modifiziert.

Dazu wurden verschiedene Medien während der 30minütigen Markierung (0,9 % NaCl-Lösung mit 10 % FCS, PBS mit 10 % FCS, HBSS mit 10 % FCS, "Medium"), verschiedene Volumina und Konzentrationen der zu markierenden Erythrozyten-suspension (200 μ l bei 5×10^7 Zellen/ml, 100 μ l bei 1×10^6 Zellen/ml), verschiedene Volumina der Natriumchromat-lösung (50, 100 und 200 μ l) überprüft und jeweils SR und TR nach 5- bzw. 20stündiger Inkubation bei 39°C im CO_2 -Brutschrank festgestellt.

2.7.1.2 Effektorzellen

Die immunisierten Tiere wurden 3 bis 5 Tage nach der letzten bzw. 8 bis 12 Tage nach der primären Immunisierung getötet, sofort die Milzen entnommen und in mit Medium beschickte Petrischalen gegeben, welche auf Eis gebettet waren. Nach Waschen und Überführung in andere, mit frischem Medium beschickte Petrischalen wurden sie mittels zweier Hakenpinzetten intensiv zerkleinert. Die

entstehende Einzelzellsuspension wurde mit einer Pasteur-pipette in 13-ml-Plastikröhrchen überführt, wo im Eiswasserbad größere Zellverbände 10 Minuten lang sedimentieren konnten, ehe der Überstand abgenommen wurde. Die über Ficoll-Paque separierten Milzlymphozyten wurden dreimal in Medium gewaschen und zu einer Suspension mit 1×10^6 Zellen aufgeschwemmt.

Von dieser Suspension wurden Verdünnungen in Medium (1:2, 1:4 und 1:8) hergestellt, um verschiedene Effektor-Zielzellverhältnisse (E/T-Ratios 100:1, 50:1, 25:1, 12,5:1) im ^{51}Cr -Release Assay einstellen zu können.

2.7.1.3 ^{51}Cr -Release-Assay

Der Ansatz wurde auf 96-Loch-Mikrotiterplatten (F-Form) durchgeführt. Dazu wurden 100 μl der Zielzellsuspension (= 1×10^5 Erythrozyten) mit 100 μl der Effektorzellsuspension in ihren verschiedenen Verdünnungen (E/T-Ratio 100:1, 50:1, 25:1, 12,5:1) inkubiert, wobei je Verdünnung mindestens 3 Dellen angesetzt wurden. Auch bei den Ansätzen mit den auf die unter 2.7.1.4 beschriebene Weise behandelten Effektorzellen wurden jeweils 100 μl Zielzell- und 100 μl Effektorzellsuspension inkubiert.

Die spontane ^{51}Cr -Freisetzung (SR = spontaneous release) und die insgesamt von den Erythrozyten inkorporierte Menge ^{51}Cr (TR = total release) wurde durch Inkubation von 100 μl Zielzellsuspension mit 100 μl Medium bzw. 100 μl Extran, einem NaOH-haltigen Reinigungsmittel, bestimmt.

Nach 20stündiger Inkubation bei 39°C im CO_2 -Brutschrank, in einigen Ansätzen zusätzlich auch nach 5 Stunden, wurden von dem zellfreien Überstand, der sich gebildet hatte, jeweils 100 μl abgenommen und die ^{51}Cr -Aktivität im Gamma-Zähler bestimmt.

Aus Dreifach-Ansätzen wurde jeweils das arithmetische Mittel gebildet, die Background-Impulse von 35 cpm (counts per minute) subtrahiert und die spezifische Zytotoxizität in Prozent nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ spez. Zytotoxizität} = \frac{\text{Freisetzung in Anwesenheit}}{\text{von Effektorzellen}} - \text{SR} \times 100$$
$$\text{TR} - \text{SR}$$

SR: spontaneous release

TR: total release

Die spontane Freisetzung (SR) betrug nach 20 Stunden normalerweise weniger als 5 % der mittels Extran freigesetzten ^{51}Cr -Aktivität (TR). Ansätze, bei denen sich die SR auf mehr als 12 % der TR belief, wurden nicht berücksichtigt.

2.7.1.4 Behandlung der Effektorzellen

Eliminierung von plastikadhärenten Zellen:

(In Anlehnung an PALLADINO et al., 1980)

Die Effektorzellauspension wurde mit Medium auf $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Jeweils 1 ml dieser Verdünnung wurde auf eine Petrischale mit 60 mm Durchmesser gegeben und durch Schwenken auf dem Boden der Schale verteilt; es wurden insgesamt 20 Petrischalen angesetzt. Die Petrischalen wurden in den CO_2 -Brutschrank gegeben und für 1 Stunde bei 39°C inkubiert. Danach wurden die nicht adhärenen Zellen durch intensives Schütteln resuspendiert und die Behandlung in frischen Petrischalen wiederholt. Nach erneutem Resuspendieren der nicht adhärenen Zellen wurden diese gesammelt, die Zellzahl bestimmt und nach einmaligem Waschen eine Suspension mit 5×10^7 Zellen/ml eingestellt.

Als Kontrolle diente ein Ansatz mit einer wiederholt resuspendierten Effektorzellsuspension (E/T-Ratio 50:1), die während der Behandlung im CO₂-Brutschrank aufbewahrt und gleichzeitig mit den behandelten Effektorzellen angesetzt wurde.

Eliminierung phagozytischer Zellen mit Karbonyleisen:

(In Anlehnung an GOLSTEIN und BLOMGREN, 1973 und LEE, 1980)

2 ml der Karbonyleisensuspension wurden in jeweils 10 ml Medium zweimal für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Nach Aufnehmen in 3,8 ml Medium wurden 200 µl der Effektorzellsuspension (1×10^6 Zellen/ml) dazugegeben und resuspendiert.

Diese Suspension wurde für 2 Stunden in den CO₂-Brutschrank (39°C) gegeben; während dieser Zeit wurde das Röhrchen alle 10 bis 15 Minuten geschüttelt und so Zellen und Karbonyleisen resuspendiert.

Nach der Inkubation wurde ein starker Ringmagnet an den Boden des Röhrchens gehalten und der Überstand in ein anderes Röhrchen abgegossen, wobei der Magnet in stetigem Kontakt mit dem Röhrchen blieb. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, das vom Magneten zurückgehaltene Sediment jeweils verworfen.

Der Überstand wurde mit Medium auf 10 ml aufgefüllt und die Zellen durch dreimaliges Zentrifugieren (jeweils 10 Minuten bei 300 g in 10 ml Medium) gewaschen und mit Medium auf 5×10^7 Zellen/ml eingestellt. Zur Kontrolle wurden Effektorzellen ohne Karbonyleisen unter gleichen Bedingungen inkubiert und dem Magnetfeld ausgesetzt.

Adsorption an mit Antikörpern beschichteten Petrischalen:

(In Anlehnung an MAGE et al., 1976; WYSOCKI und SATO, 1978; CIHAK et al., zur Veröffentlichung eingesandt)

Je Ansatz wurden 2 Petrischalen (100 mm Durchmesser) verwendet, welche mit normalem bovinem Immunglobulin und Anti-Huhn-IgG (K3I) beschichtet waren. Dazu wurde jede Petrischale mit 10 ml einer Lösung von 10 µg/ml bovinem Immunglobulin und 2 µg/ml K3I in PBS beschickt und eine Stunde lang bei Zimmertemperatur stehengelassen, dann die Schalen abgegossen und dreimal mit je 10 ml PBS gespült. Abschließend wurde ein viertes Mal mit Hepes-gepuffertem RPMI 1640 gewaschen, das 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % L-Glutamin und 10 % FCS enthielt.

Daraufhin wurden auf jede Schale 3 ml Milzzellsuspension, eingestellt auf 1×10^7 Zellen/ml in Hepes-gepuffertem Medium (Zusammensetzung wie oben), gegeben und für 1 Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert, wobei nach 30 Minuten und 60 Minuten nicht adhärierende Zellen durch Bewegen der Platten resuspendiert wurden.

Schließlich wurden mit einer Pasteurpipette die nicht adhärierenden Zellen abgenommen, die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung und NEUBAUERScher Zählkammer festgestellt und nach Abzentrifugieren und einmaligem Waschen mit Medium (bicarbonatgepuffert) eine Suspension von 5×10^7 Zellen/ml hergestellt, die im ^{51}Cr -Release-Assay eingesetzt wurde.

Ein Kontrollansatz wurde analog wie bei der Eliminierung plastikadhärenter Zellen durchgeführt.

ATS-Komplement-Behandlung:

100 μ l der Effektorzellsuspension (1×10^6 Zellen/ml) wurden mit 100 μ l ATS (1:3,3 in Medium vorverdünnt) für 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, dann 100 μ l Komplement (C4, 1:5 vorverdünnt) dazugegeben und für weitere 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad gehalten. Gleichzeitig wurden Ansätze ohne ATS und C4, nur mit ATS und nur mit C4 gemacht, wobei das Volumen jeweils durch Zugabe der entsprechenden Menge Medium ausgeglichen wurde.

Nach der insgesamt einstündigen Inkubation wurden die Zellen durch dreimaliges Zentrifugieren (jeweils 5 Minuten bei 300 g in 5 ml Medium) gewaschen und schließlich mit Medium ad 200 μ l aufgefüllt und resuspendiert. Diese Zellsuspensionen wurden im ^{51}Cr -Release-Assay als Effektorzellen verwendet.

Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper TCR2

Aus den TCR2-haltigen Präparationen 6-24 und 6-27 sowie den Kontrollantikörpern 16-N und T₁₀A₈ (siehe 2.2) wurden mit Medium Verdünnungen von 1:5, 1:25 und 1:125 hergestellt. Jeweils 10 μ l der unverdünnten Präparationen beziehungsweise der Verdünnungen wurden zu 100 μ l Effektorzellsuspension (in Mikrotitrationsplatten) gegeben. Unmittelbar danach wurden 100 μ l Zielzellsuspension hinzugefügt und die Platten bis zur Auswertung in den CO₂-Brutschrank gegeben. Das Effektor-Zielzellverhältnis betrug 50:1; es wurden jeweils Dreifachansätze gemacht.

2.7.2 Virusinduzierte zellvermittelte Immunität

2.7.2.1 Zielzellen

Als Zielzellen im ^{51}Cr -Release-Assay fanden mit NDV infizierte Hühnerembryofibroblasten (HEF) aus Einschicht-Zellkulturen Anwendung, welche bezüglich des MHC mit den jeweiligen immunisierten Tieren (B2, B19) identisch waren (virusinfizierte syngenetische Zielzellen).

Zubereitung

- Anlegen der HEF-Einschicht-Zellkulturen
(In Anlehnung an MAYR et al., 1974)

Aus bebrüteten Hühnereiern wurden unter sterilen Bedingungen am 9. bis 11. Bebrütungstag die Embryonen entnommen, in 100-mm-Petrischalen in HBSS gesammelt, mehrmals mit HBSS gespült und in neuen Petrischalen mit HBSS präpariert (Entfernung von Köpfen und Eingeweiden). Die präparierten Embryonen wurden durch eine 20-ml-Glasspritze (LUER-Konus) in einen Erlenmeyer-Kolben gedrückt, welcher 50 - 100 ml 0,25 %ige Trypsinlösung enthielt, und mit einem Magnetrührer (200 Umdrehungen/Minute) 45 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach dreiminütiger Sedimentation größerer Zellverbände wurde der Überstand durch mehrlagige sterile Verbandgaze filtriert und das Filtrat in Portionen zu 20 bis 30 ml für 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in Zellkulturwachstumsmedium aufgenommen und durch dreimaliges Zentrifugieren bei 300 g für jeweils 10 Minuten gewaschen. Nach Zellzahlbestimmung (Trypanblaufärbung, NEUBAUERsche Zählkammer) wurde eine Einzelzell-suspension mit 6 bis 8 x 10⁵ Zellen/ml in Zellkulturwachstumsmedium hergestellt und davon jeweils 10 ml in 50-ml-Gewebekulturflaschen gegeben, welche mit losem

Verschluß im CO₂-Brutschrank bei 39°C gehalten wurden. Nach 36 bis 40 Stunden wurde der Zellrasen unter dem Mikroskop kontrolliert, das Zellkulturwachstumsmedium gegen Zellkulturerhaltungsmedium ausgetauscht und weiter im CO₂-Brutschrank inkubiert.

- Infizierung der HEF mit NDV

Aus dem lyophilisierten Impfstoff Sotavax wurde mit Zellkulturerhaltungsmedium eine Lösung mit 1×10^7 EID₅₀/ml hergestellt, davon je 0,5 ml ($= 5 \times 10^6$ EID₅₀) auf die zu infizierenden Zellkulturen gegeben und durch vorsichtiges Kippen der Gewebekulturflaschen gleichmäßig verteilt. Die Infizierung fand unmittelbar nach dem Mediumwechsel statt.

- Weitere Zubereitung der Zielzellen

Nach weiteren 40 Stunden wurde das Medium abgegossen und die Fläschchen dreimal mit jeweils 10 ml 37°C warmem RPMI 1640 gespült. Danach wurde der Zellrasen mit 1 ml 0,25 % Trypsinlösung von 37°C überschichtet und 1 - 2 Minuten gewartet, bis sich das Zellhäutchen vom Flaschenboden löste. Daraufhin wurden 10 ml PBS mit 10 % FCS dazugegeben und die Zellen durch intensives Durchpipettieren vereinzelt. Nach dreimaligem Zentrifugieren in PBS + 10 % FCS bei 300 g wurde die Suspension auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und 200 µl davon mit 200 µl Natriumchromatlösung für 30 Minuten im Brutschrank bei 39°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen in Medium für jeweils 10 Minuten bei 300 g wurde das Pellet auf 10 ml aufgefüllt und resuspendiert, so daß eine Suspension mit 2×10^5 Zellen/ml entstand, welche im ⁵¹Cr-Release-Assay eingesetzt wurde.

Vorversuche zum ^{51}Cr -Release-Assay

Auch bei den Versuchen mit der NDV-Immunisierung wurden zunächst die Bedingungen optimiert, unter denen NDV-infizierte Hühnerembryofibroblasten als Zielzellen im ^{51}Cr -Release-Assay Verwendung finden können.

- Kontrolle der NDV-Infektion der HEF-Kulturen nach Infektion mit verschiedenen Virusdosen

HEF-Zellkulturen wurden nach dem Mediumwechsel mit Virusdosen von 5×10^4 , 5×10^5 , 5×10^6 und 5×10^7 infiziert (Sotavax in Zellkulturerhaltungsmedium verdünnt). Nach 40 Stunden Inkubation im CO_2 -Brutschrank bei 39°C wurde mittels direkter Immunfluoreszenz der prozentuale Anteil der Zellen bestimmt, welche mit dem NDV-Konjugat reagierten.

Hierzu wurden die Zellkulturen gewaschen, trypsiniert, die Zellen vereinzelt und dreimal gewaschen; die Sedimente wurden jeweils in 1 ml PBS aufgenommen und resuspendiert. Jeweils 10 und 50 μl jeder einzelnen Suspension wurden in 1,5 ml Eppendorf-Cups mit 50 μl Fluorescein-isothiozyanat-gekoppelten NDV-Antikörper (Anti-NDV-Konjugat, Verdünnung mit PBS 1:8) vermischt und 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert, danach dreimal in jeweils 1 ml PBS + 2 % FCS 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Das Zellsediment wurde resuspendiert und von der Suspension 5 μl auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Kunstharzlack eingesiegelt. Die Präparate wurden im Fluoreszenzmikroskop beurteilt und nicht fluoreszierende und fluoreszierende Zellen ausgezählt, wobei mindestens 200 Zellen ausgewertet wurden.

- SR und TR unter modifizierten Bedingungen

Verschiedene Medien bei der Markierung (nicht infizierte HEF)

Die HEF wurden nach 2.7.2.1 zubereitet und nach Vereinzelung der Zellen in verschiedenen Medien aufgenommen: RPMI 1640 mit 10 % FCS, HBSS mit 10 % FCS und PBS mit 10 % FCS. Nach der 30minütigen Markierung bei 39°C (bei RPMI 1640 und HBSS im CO₂-Brutschrank) und Waschen der markierten Zellen in Medium wurden SR und TR nach vierstündiger Inkubation ermittelt.

FCS-Gehalt des Zellkulturerhaltungsmediums (nicht infizierte HEF)

Die HEF wurden nach 2.7.2.1 zubereitet, wobei das Zellkulturwachstumsmedium einerseits durch Zellkulturerhaltungsmedium (1,5 % FCS-Gehalt), andererseits durch ein genauso wie das Zellkulturwachstumsmedium zusammengesetztes Medium ersetzt wurde. Zubereitung und Ansatz des ⁵¹Cr-Release-Assay zur Bestimmung von SR und TR erfolgten nach 2.7.2.3.

Menge der Natriumchromatlösung (nicht infizierte HEF)

200 µl der nach 2.7.2.1 zubereiteten Zellsuspensionen wurden mit 50 bzw. 200 µl der Natriumchromatlösung unter sonst gleichen Bedingungen markiert und SR und TR nach vierstündiger Inkubation festgestellt.

Einfluß der NDV-Infektion auf SR und TR

SR und TR von HEF aus nicht infizierten und NDV-infizierten Zellkulturen (Infizierung mit 5×10^6 und 5×10^7 EID₅₀) wurden nach 4 Stunden Inkubationszeit gemessen.

2.7.2.2 Effektorzellen

Die Zubereitung der Effektorzellen wurde genauso durchgeführt wie unter 2.7.1.2 geschildert, mit dem Unterschied, daß die Zellsuspension auf 4×10^7 Zellen/ml eingestellt und E/T-Ratios von 200:1, 66:1 und 22:1 im ⁵¹Cr-Release-Assay angewendet wurden.

2.7.2.3 ⁵¹Cr-Release-Assay

Der Ansatz auf 96-Loch-Mikrotiterplatten (F-Form) wurde in der gleichen Weise durchgeführt wie unter 2.7.1.3 beschrieben. Ebenso wurde die spontane Freisetzung und die insgesamt inkorporierte ⁵¹Cr-Aktivität festgestellt. Es wurde gleichzeitig auch gegen nicht infizierte, sonst auf die gleiche Art zubereitete HEF getestet, wobei jedesmal auch Milzzellen eines nicht immunisierten Tieres auf zytotoxische Aktivität geprüft wurden.

Die Inkubationszeit im CO₂-Brutschrank bei 39°C betrug 4 Stunden; nach dieser Zeit wurden 100 µl des Überstands abgenommen und nach Bestimmung der ⁵¹Cr-Aktivität im Gamma-Zähler die spezifische Zytotoxizität nach der gleichen Formel (siehe 2.7.1.3) berechnet.

Die spontane Freisetzung betrug bei HEF als Zielzellen normalerweise etwa 20 % bei infizierten Zellen und 30 % bei NDV-infizierten Zellen, in einzelnen Ansätzen jedoch bis zu 30 % bzw. 42 %, bezogen auf die insgesamt inkorporierte Menge ⁵¹Cr.

3. ERGEBNISSE

3.1. Vorversuche

3.1.1 Wirksamkeit und unspezifische Toxizität der einzelnen komplementhaltigen Seren

Die Überprüfung der einzelnen komplementhaltigen Seren (C1 - C5) an Bursazellen mit oder ohne Zugabe von Anti-bursazellserum (ABS) ergab, daß das Serum C4 bei fehlender Toxizität die größte Wirksamkeit besitzt. Tabelle 1 zeigt die Anzahl der überlebenden Bursazellen (in Prozent der festgestellten Zellzahl nach Inkubation mit HBSS + 10 % FCS) nach Behandlung mit ABS allein (Verdünnung 1:6), Komplement allein (Verdünnung 1:15) sowie ABS und Komplement in den genannten Verdünnungen.

In den weiteren Versuchen fand ausschließlich das Serum C4 als Komplementquelle Verwendung.

Komplement- quelle	Überlebende Bursazellen (%) nach Behandlung mit			
	Komplement	ABS + Komplement		ABS
	1:15	1:6	1:15	1:6
C1	90	23		
C2	100	41		
C3	92	27		> 95
C4	100	13		
C5	100	22		

Tabelle 1: Wirksamkeit und Toxizität der einzelnen komplementhaltigen Seren (C1 - C5)

3.1.2 Wirksamkeit und Spezifität des Antithymuszellserums (ATS)

Mit dem ATS konnten bei einer Endverdünnung von 1:10 in Anwesenheit von Komplement (C4, 1:15) 73 % bzw. 26 % der Zellen einer Thymus- bzw. Milzzellsuspension getötet werden, wogegen Bursazellen zu mehr als 95 % überlebten. Das ATS führte in höherer Konzentration (ab 1:8) auch ohne Zugabe von Komplement zu einer starken Agglutination von Thymus- und Milzzellen, was bei Bursazellen in keinem Ansatz beobachtet wurde.

Tabelle 2 zeigt die Anzahl überlebender Zellen (in Prozent der festgestellten Zellzahl nach Inkubation mit Medium) nach Behandlung von Thymus-, Bursa- und Milzzellen mit ATS und/oder Komplement (C4) in verschiedenen Verdünnungen.

Art der Behandlung	Überlebende Zellen (%) nach der Behandlung		
	Thymuszellen	Bursazellen	Milzzellen
ATS (1:4)	*)	99	*)
ATS (1:8)	*)	96	*)
ATS (1:10)	78	100	90
ATS (1:100)	83	100	95
ATS (1:4) + C4 (1:4)	*)	94	*)
ATS (1:8) + C4 (1:8)	*)	98	74
ATS (1:10) + C4 (1:15)	27	96	74
ATS (1:100) + C4 (1:15)	35	95	77
C4 (1:4)	80	89	76
C4 (1:8)	100	98	100
C4 (1:15)	100	100	100

*) Die Zellzahlbestimmung war wegen starker Agglutination nicht möglich.

Tabelle 2: Wirksamkeit und Spezifität des ATS

3.1.3 Erythrozyten als Zielzellen im ^{51}Cr -Release-Assay

Die Bestimmung der insgesamt inkorporierten (TR) und spontan freigesetzten (SR) ^{51}Cr -Aktivität nach ^{51}Cr -Markierung unter modifizierten Bedingungen ergab die in Tabelle 3 aufgeführten Werte. Die Tabelle zeigt den Einfluß verschiedener Medien während der Markierung (Ansätze 1a bis 1d), verschiedener Volumina der zur Markierung verwendeten Natriumchromatlösung (Ansatz 2) sowie verschiedener Volumina und Konzentrationen der zu markierenden Erythrozyten-suspension (Ansatz 3). Die Markierung nach der unter 2.7.1.1 geschilderten Methode ist sowohl hinsichtlich TR als auch SR den anderen beschriebenen Modifikationen überlegen.

MODIFIKATION	TR absolut (cpm)	SR absolut (cpm)	SR relativ (%)	Inkubations- zeit (Stunden)
Ansatz 1: Medien				
a PBS + 10 % FCS "Medium"	715 676	16. 29	2,2 4,3	5
b PBS + 10 % FCS HBSS + 10 % FCS	1335 1214	19 100	1,4 8,2	20
c PBS + 10 % FCS 0,9 % NaCl + 10 % FCS	1870 1937	132 166	7,1 8,6	5
d PBS + 10 % FCS 0,9 % NaCl + 10 % FCS	1543 1633	77 120	4,5 7,3	20
Ansatz 2: Na ₂ CrO ₄ -Lösung				
200 µl	1335	19	1,4	
100 µl	1006	29	2,9	20
50 µl	872	34	3,9	
Ansatz 3: Erythrozytensuspension				
100 µl mit 1 x 10 ⁸ Zellen/ml	2005	38	1,9	20
200 µl mit 5 x 10 ⁷ Zellen/ml	1568	53	3,4	

SR: spontaneous release

TR: total release

Tabelle 3: SR und TR von Erythrozyten nach Markierung unter verschiedenen Bedingungen

3.1.4 NDV-infizierte Hühnerembryofibroblasten (HEF) als Zielzellen im ^{51}Cr -Release-Assay

3.1.4.1 Kontrolle der NDV-Infektion

Mittels direkter Immunfluoreszenz wurde die Rate infizierter Zellen, welche das NDV-Antigen an ihrer Oberfläche exprimieren, bestimmt. Nach Infizierung identisch angelegter Zellkulturen mit verschiedenen VirUSDosen zeigte sich das in Tabelle 4 dargestellte Ergebnis. 40 Stunden nach der Infizierung erwiesen sich nur die Zellkulturen als vollständig (nahezu 100 %) infiziert, welche mit 5×10^7 EID₅₀ beimpft worden waren. Eine VirUSDosis von 5×10^6 EID₅₀ führte bei 95 % der Zellen zu einer positiven Reaktion.

Virusdosis (EID ₅₀)	NDV-positive Zellen (%)
5×10^4	< 10
5×10^5	55
5×10^6	95
5×10^7	> 98

Tabelle 4: Kontrolle der NDV-Infektion bei Hühner-embryofibroblasten (HEF)

3.1.4.2 Verschiedene Bedingungen während der Markierung

Tabelle 5 gibt Aufschluß über TR und SR von HEF nach Markierung in verschiedenen Medien (Ansatz 1), nach unterschiedlicher Behandlung der Zellkulturen (Ansatz 2), nach Markierung mit verschiedenen Volumina der Natriumchromat-lösung (Ansatz 3) sowie über die Auswirkung der NDV-Infizierung in verschiedenen Dosen auf TR und SR (Ansatz 4). Die unter 2.7.2.1 geschilderte Art der Zielzellpräparation ist sowohl im Hinblick auf TR als auch SR den anderen beschriebenen Modifikationen überlegen. Für die Infizierung der Zellkulturen wurde die Virusdosis 5×10^6 EID₅₀ gewählt, nachdem SR und TR bei 5×10^7 EID₅₀ nicht mehr tragbar erschienen.

3.1.5 Auswirkung der neonatalen Cyclophosphamid-behandlung

Im Folgenden werden Tiere als agammaglobulinämisch bezeichnet, bei denen mittels der im Labor gebräuchlichen Immunelektrophorese weder IgG noch IgM im Serum nachgewiesen werden konnte. Dies war bei etwa 40 % der cyclophosphamidbehandelten Hühner der Fall. Bei den anderen cyclophosphamidbehandelten Tieren waren Serumimmunglobuline eindeutig feststellbar; dies wird als IgG + bzw. IgM + gekennzeichnet.

Bei einer 14 Tiere umfassenden Gruppe, die zusätzlich unmittelbar nach dem Schlupf gegen die Mareksche Krankheit geimpft worden war, konnten bei keinem Huhn Serumimmunglobuline nachgewiesen werden.

Die immunelektrophoretische Nachweisgrenze für IgG liegt bei etwa 0,3 %, für IgM bei 2 % des Normwerts.

Modifikationen	TR absolut (cpm)	SR absolut (cpm)	SR relativ (%)
Ansatz 1:			
Medien RPMI 1640 + 10 % FCS	220	72	32,7
HBSS + 10 % FCS	386	61	16,6
PBS + 10 % FCS	702	87	12,4
Ansatz 2:			
Zellkulturerhaltungsmedium mit			
5 % FCS	407	40	9,8
1,5 % FCS	513	49	9,6
Ansatz 3:			
Na ₂ CrO ₄ -Lösung 50 µl	363	46	12,7
200 µl	878	106	11,8
Ansatz 4:			
Infektion der REF:			
Keine Infizierung	1018	96	9,4
Infizierung mit 5 x 10 ⁶ EID ₅₀	1001	247	24,7
Infizierung mit 5 x 10 ⁷ EID ₅₀	435	191	43,9

SR: spontaneous release

TR: total release

Tabelle 5: TR und SR bei Hühnerembryofibroblasten unter verschiedenen Bedingungen
(4 Stunden Inkubationszeit)

3.2 Zellvermittelte Zytotoxizität gegen Alloantigene

3.2.1 Induzierung einer zellvermittelten Immunantwort

Durch die wiederholte wöchentliche intravenöse Verabreichung von allogenen Blutzellen konnte zytotoxische Aktivität in den Milzzellen der Empfängertiere hervorgerufen werden. Diese im ^{51}Cr -Release-Assay nachweisbare Aktivität war sowohl bei cyclophosphamidbehandelten (Tabelle 6: Immunisierung mit B12, Tabelle 7: Immunisierung mit B5) als auch immunologisch intakten (nicht cyclophosphamidbehandelten, Tabelle 8) Tieren der Linie RPRL6 (B2) ausgeprägt und drei, vier und fünf Tage nach der letzten Injektion feststellbar.

Eine deutliche Reaktion zeigt sich regelmäßig nach mindestens vier Injektionen, während nach dreimaliger Immunisierung nur eine beträchtlich schwächere Immunantwort nachgewiesen werden konnte. Nach primärer Immunisierung mit mitomycinbehandelten Blutleukozyten konnte Zytotoxizität weder am achten, zehnten noch zwölften Tag demonstriert werden. Milzzellen von nicht immunisierten RPRL6-Hühnern zeigten in keinem Fall eine zytotoxische Reaktion gegenüber den als Zielzellen verwendeten Erythrozyten.

Das optimale Effektor-Zielzellverhältnis (E/T-Ratio) lag bei den meisten Ansätzen mit 20 Stunden Inkubationszeit bei 50:1. In einigen Fällen lag zwar die Aktivität bei einer E/T-Ratio von 100:1 höher, in anderen jedoch kam es hierbei zu einer weitgehenden Hemmung, was bei 50:1 nur ausnahmsweise der Fall war. Die Zytotoxizität nahm mit fallender E/T-Ratio ab, war jedoch bei 12,5:1 und - in drei Ansätzen überprüft - auch bei 6:1 (vergleiche Abbildung 2) noch deutlich nachweisbar.

Nach einer Inkubationszeit von fünf Stunden war regelmäßig zytotoxische Aktivität im ^{51}Cr -Release-Assay festzustellen. Diese lag jedoch sehr viel niedriger als bei vergleichbaren 20-Stunden-Ansätzen. Abbildung 1 verdeutlicht diesen Sachverhalt anhand der Daten zweier repräsentativer Experimente, welche mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt wurden.

3.2.2 Spezifität der zellvermittelten Immunantwort

Die Spezifität der zytotoxischen Reaktion wurde überprüft, indem in allen Ansätzen gleichzeitig syngene Erythrozyten (RPRL6 - B2) als Zielzellen angewendet wurden. Hierbei kam es in keinem Fall - weder bei cyclophosphamidbehandelten noch bei immunologisch intakten Tieren - zu einer nachweisbaren Aktivität. Abbildung 2 zeigt die zytotoxische Aktivität von Milzzellen einzelner Tiere gegenüber B2- und B12-Erythrozyten am vierten Tag nach der letzten Immunisierung mit B12-Blutzellen.

Anzahl der Immunisierungen	Tage nach der (letzten) Injektion	Serum-Immunglobuline (Empfängertiere)		Spezifische Zytotoxizität (%)			
		IgG	IgM	E/T-Ratio			
				100:1	50:1	25:1	12,5:1
1	8	+	+	- 1,2	- 0,6	- 0,1	+ 0,1
	10	-	+	- 0,7	- 1,2	- 0,7	- 1,2
	12	+	+	- 0,1	+ 0,1	- 0,1	- 0,3
3	3	+	+	11	11	10	9
	4	+	+	- 5,2	13	24	22
4	3	-	+	44	22	30	12
	4	-	-	5,3	28	38	24
	4	-	-	0,9	24	21	14
	4	-	-	n.d.	40	33	22
5	4	-	-	n.d.	25	19	11
	4	-	-	0,0	20	18	9
	5	+	+	65	65	46	27
6	4	-	-	5,4	37	60	47
	4	-	-	26	58	54	34
nicht immunisiert		-	-	- 1,9	0,0	- 1,0	- 1,9
		+	+	1,5	- 2,1	- 3,0	- 4,5

Tabelle 6: Zytotoxische Aktivität von Milzzellen cyclophosphamidbehandelter Tiere der Linie RPRL6 gegenüber B12-Erythrozyten nach Immunisierung mit B12-Blutzellen bei einer Inkubationsdauer von 20 Stunden (n. d. = nicht durchgeführt).

Anzahl der Immunisierungen	Tage nach der (letzten) Injektion	Serum-Immunglobuline (Empfängertiere)		Spezifische Zytotoxizität (%)			
		IgG	IgM	E/T-Ratio			
				100:1	50:1	25:1	12,5:1
4	3	-	-	29	30	20	n.d.
5	5	-	-	4,9	4,2	0,9	0,0
nicht immunisiert		+	+	- 3,7	- 4,8	- 6,9	- 4,1

Tabelle 7: Zytotoxische Aktivität von Milzzellen cyclophosphamidbehandelter Tiere der Linie RPRL6 gegenüber B5-Erythrozyten nach Immunisierung mit B5-Blutzellen bei einer Inkubationszeit von 20 Stunden (n.d. = nicht durchgeführt)

Anzahl der Immunisierungen	Spezifische Zytotoxizität (%)			
	E/T-Ratio			
	100:1	50:1	25:1	12,5:1
4	n.d.	42	32	23
5	58	52	46	24
6	39	29	17	9
6	23	16	9	1,3
9	45	35	15	4,9
nicht immunisiert	- 0,8	+ 0,8	- 0,4	- 0,3

Tabelle 8: Zytotoxische Aktivität von Milzzellen nicht cyclophosphamidbehandelter Tiere der Linie RPRL6 gegenüber B12-Erythrozyten nach Immunisierung mit B12-Blutzellen bei 20 Stunden Inkubationszeit; alle Tiere wurden am vierten Tag nach der letzten Immunisierung untersucht (n.d. = nicht durchgeführt).

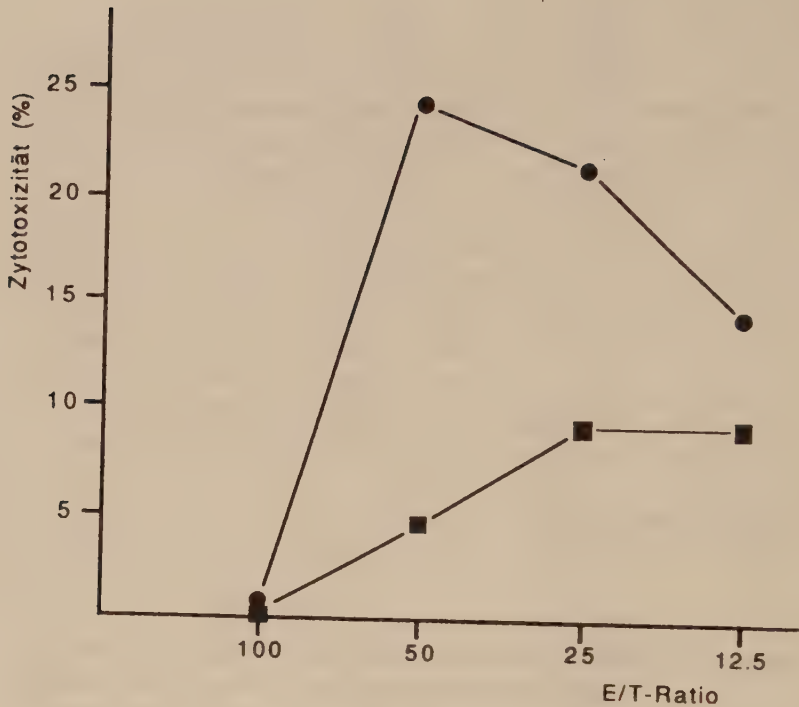


Abb.1a

Abbildung 1: Einfluß der Inkubationsdauer im ^{51}Cr -Release-Assay: zytotoxische Aktivität gegen B12-Erythrozyten nach 20 (●) bzw. 5 (■) Stunden; die Effektorzellen stammen von einem agammaglobulinämischen (IgG-, IgM-) cyclophosphamidbehandelten (Abbildung 1 a) bzw. einem nicht cyclophosphamidbehandelten (Abbildung 1 b) RPRL6-Huhn und wurden jeweils am vierten Tag nach der vierten (1 a) bzw. sechsten (1 b) Immunisierung gewonnen.

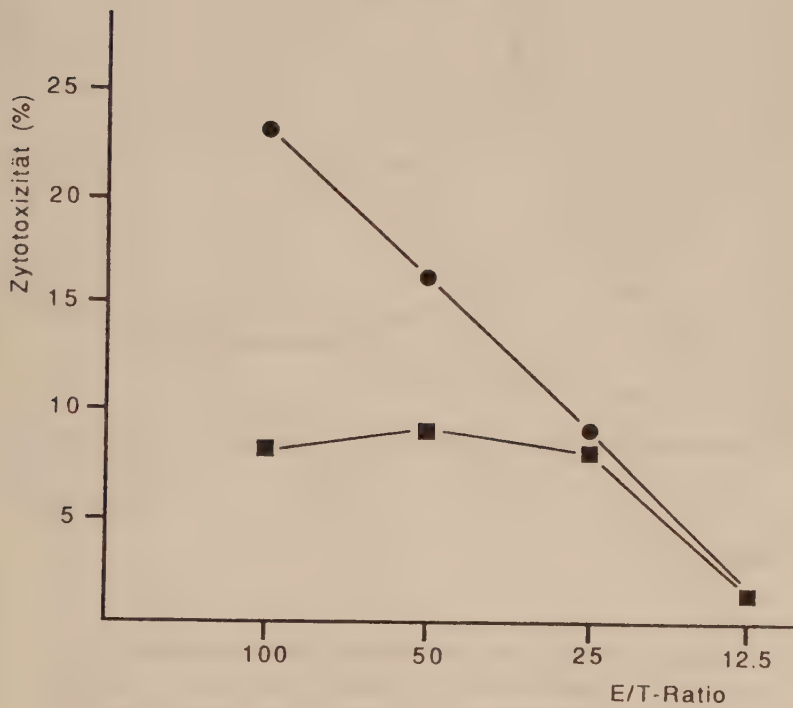


Abb.1b

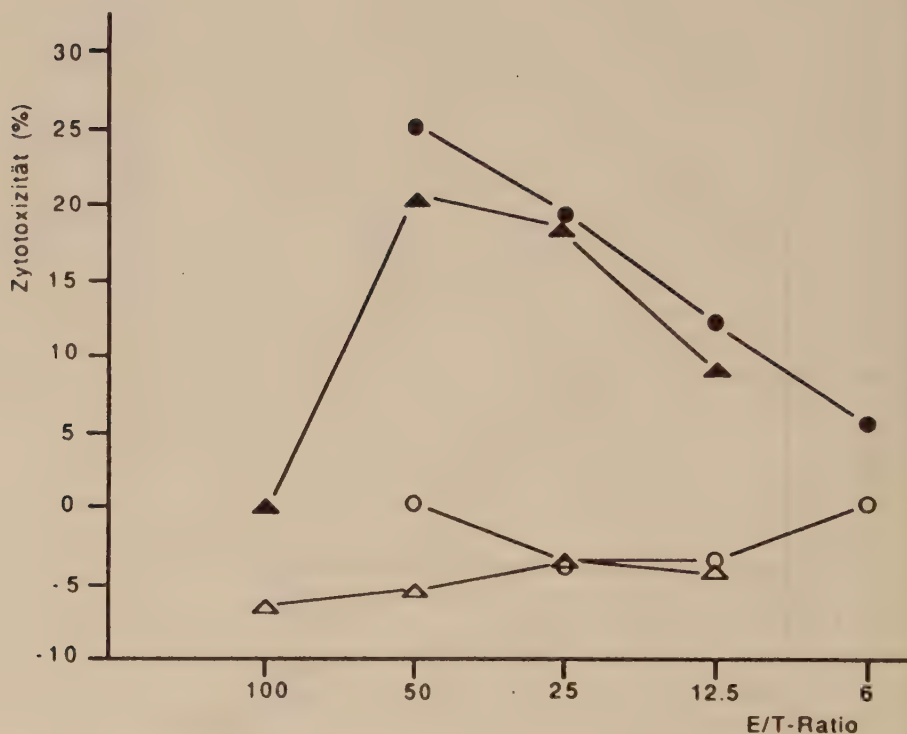


Abb.2a

Abbildung 2: Spezifität der zytotoxischen Reaktion:

Zytotoxische Aktivität von Milzzellen mit B12-Blutzellen immunisierter Hühner gegen B12 (●,▲)- und B2 (○,△)-Erythrozyten; die Effektorzellen stammen von jeweils zwei agammaglobulinämischen (IgG-, IgM-) cyclophosphamidbehandelten (Abbildung 2 a) bzw. immunologisch intakten (Abbildung 2 b) Tieren der Linie RPRL6.

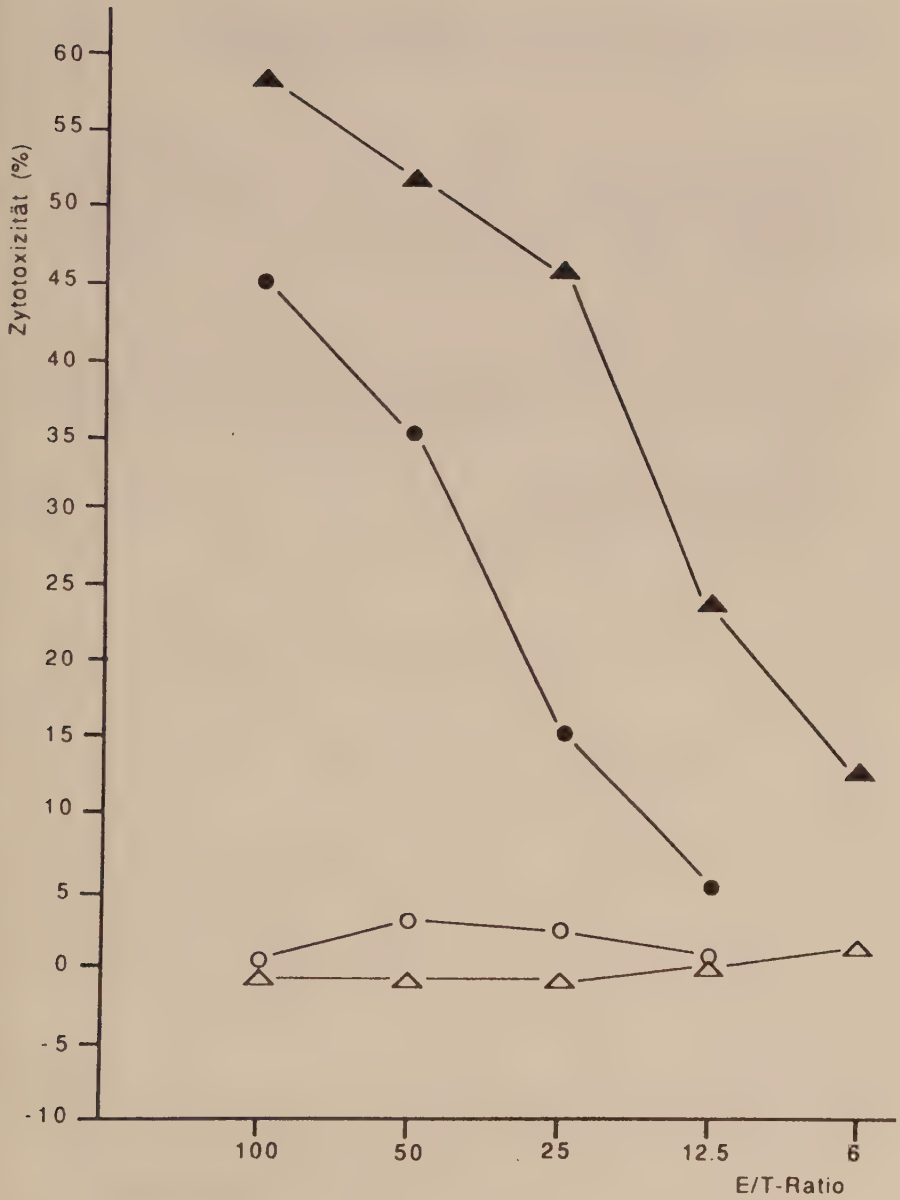


Abb.2b

3.2.3 Einfluß der verschiedenen Fraktionierungsmethoden auf die zytotoxische Aktivität

In diesen Versuchen fanden ausschließlich entweder agammaglobulinämische (IgG-, IgM-, im Folgenden als A γ -Tiere bezeichnet) oder nicht cyclophosphamidbehandelte Tiere (Non-CY-Tiere) Verwendung, die mit B12-Blutzellen immunisiert und am vierten Tag nach der letzten Injektion auf zytotoxische Aktivität untersucht wurden. Das Effektor-Zielzellverhältnis betrug durchwegs 50:1; nach der ATS- und/oder Komplementbehandlung wurde die Suspension nicht neu eingestellt, sondern das nach dem Waschen verbliebene Pellet mit Medium auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

3.2.3.1 Zytotoxizität nach Eliminierung plastik-adhärenter Zellen

Von den angesetzten 20 ml Zellsuspension blieben nach dem wiederholten Abgießen und Sammeln 12 ml übrig (d. h. 40 % technisch bedingte Verluste); diese Suspension enthielt insgesamt $2,6 \times 10^7$ Zellen, was einem Anteil adhärenter Zellen von etwa 13 % entspricht.

Bei Effektorzellen von A γ -Tieren gelang es nicht, die zytotoxische Aktivität zu hemmen; sie war im Vergleich zum Kontrollansatz unverändert oder etwas erhöht.

Bei Non-CY-Tieren konnte eine weitgehende Hemmung erreicht werden. Nicht adhärenre Milzzellen besaßen nur noch 8 % bzw. 31 % der zytotoxischen Aktivität der Kontrollansätze.

Tabelle 9 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche.

Tiere	Spezifische Zytotoxizität (%)		Hemmung (%)
	Kontrollansatz	Nichtadhärente Zellen	
A γ	12	17	- *)
	15	18	-
	17	16	5,9
Non-CY	35	2,9	92
	54	17	69

*) Keine Hemmung nachweisbar

Tabelle 9: Zytotoxizität nach Eliminierung plastik-adhärenter Zellen

3.2.3.2 Zytotoxizität nach Eliminierung phagozytierender Zellen mit Karbonyleisen

Die Behandlung der Effektorzellsuspensionen mit Karbonyleisen und Magnet führte zu einem Zellverlust von 20 % bis 25 %. Allerdings war auch beim Kontrollansatz ohne Karbonyleisen die Zellzahl um 5 % bis 10 % der ursprünglichen Zellzahl gegenüber gemindert.

Bei Milzzellsuspensionen von A_γ-Tieren war nach der Behandlung durchwegs höhere zytotoxische Aktivität festzustellen als bei der Kontrolle, während bei Non-CY-Tieren die Reaktion um 18 % bis 25 % gehemmt wurde (Tabelle 10).

Tiere	Spezifische Zytotoxizität (%)		Hemmung (%)
	Kontrollansatz	Karbonyleisen + Magnet	
A _γ	18	24	- *)
	47	55	-
	29	33	-
	12	17	-
Non-CY	52	39	25
	49	40	18

*) Keine Hemmung nachweisbar

Tabelle 10: Zytotoxizität nach Eliminierung phagozytierender Zellen

3.2.3.3 Zytotoxizität nach Absorption an mit Antikörpern beschichtete Petrischalen

Die Absorption an mit Anti-Huhn-IgG beschichtete Petrischalen führte zu einer Ausbeute von etwa 90 % der ursprünglich vorhandenen Zellzahl in der effluenten Fraktion, welche als Effektorzellsuspension verwendet wurde.

Eine Hemmung der zytotoxischen Aktivität durch diese Methode konnte weder bei Milzzellen von A γ -Tieren noch von Non-CY-Tieren festgestellt werden (Tabelle 11).

Tiere	Spezifische Zytotoxizität (%)		Hemmung (%)
	Kontrollansatz	Effluente Fraktion	
A γ	12	17	- *)
	15	21	-
Non-CY	54	52	3,7

*) Keine Hemmung nachweisbar

Tabelle 11: Zytotoxizität nach Absorption an mit Anti-Huhn-IgG beschichtete Petrischalen

3.2.3.4 Zytotoxizität nach ATS-Komplement-Behandlung

Effektorzellen von A γ -Tieren verloren nach Inkubation mit ATS allein den größten Teil ihrer zytotoxischen Aktivität (82 % bis 98 % Hemmung im Vergleich zum Kontrollansatz, Tabelle 12). Bei Milzzellen von Non-CY-Tieren wurde nach Behandlung mit ATS ebenfalls eine Abnahme beobachtet, die jedoch sehr viel weniger ausgeprägt war (13 bis 26 %). Die Inkubation mit ATS und Komplement bewirkte kaum eine verstärkte Inhibition im Vergleich zu ATS allein; Komplement allein zeigte keine Wirkung.

Tiere	Spez. Zytotoxizität (%)				Hemmung (%)	
	K	ATS	ATS+C	C	ATS	ATS+C
A γ	25	0,5	16	33	98	36
	33	6	5,3	38	82	84
Non-CY	24	21	17	n.d.	13	19
	34	25	21	34	26	38
	40	30	31	42	25	23

K: Kontrollansatz

ATS: Behandlung nur mit Antithymuszellserum (1:10)

C: Behandlung nur mit Komplement (1:15)

ATS+C: Behandlung mit Antithymuszellserum (1:10) und Komplement (1:15)

Tabelle 12: Zytotoxizität nach ATS-Komplement-Behandlung (n. d. = nicht durchgeführt)

3.2.3.5 Zytotoxizität nach Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper (mab) TCR2

Die Inkubation mit den TCR2-haltigen Antikörper-Zubereitungen 6-24 und 6-27 bewirkte bei Effektorzellen von immunisierten A γ -Tieren eine deutliche Hemmung bis 68 % der ursprünglichen Aktivität. Diese Hemmung nahm mit steigender Verdünnung der mab ab und war nach Zugabe der 1:125-Verdünnung nicht oder nur mehr minimal nachweisbar.

Bei Milzzellen von Non-CY-Tieren konnte durch die gleiche Behandlung nur eine geringgradige Hemmung der zytotoxischen Aktivität (bis zu 12 %) erreicht werden. Auch diese Hemmung war abhängig von der Verdünnung des mab und bei höheren Verdünnungen (1:25, 1:125) nicht mehr nachweisbar.

Die Kontrollantikörper 16-N und T₁₀A₆ hatten sowohl bei Effektorzellen immunisierter A γ -Tiere als auch Non-CY-Tiere keinen oder allenfalls minimalen Einfluß auf die zytotoxische Reaktion.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muß berücksichtigt werden, daß die ursprünglichen Verdünnungen der mab (unverdünnt, 1:5, 1:25 und 1:125) während des Ansatzes zunächst mit der Effektorzellsuspension (1:11), dann mit der Zielzellsuspension (11:21) verdünnt werden, so daß Endverdünnungen von etwa 1:20, 1:100, 1:500 und 1:2500 bestehen.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 13 dargestellt.

Behandlung der Effektorzellen		Tiere									
		A Y 4 x immunisiert		A Y 4 x immunisiert		Non-CY 4 x immunisiert		Non-CY 5 x immunisiert			
sub	Endverdünnung	Zytotox. (%)	Hemmung (%)	Zytotox. (%)	Hemmung (%)	Zytotox. (%)	Hemmung (%)	Zytotox. (%)	Hemmung (%)	Zytotox. (%)	Hemmung (%)
6-24	1:20	9	68	13	48	37	12	48	8		
	1:100	11	61	14	44	39	7	49	5,8		
	1:500	22	21	20	20	42	- a)	51	1,9		
	1:2500	28	-	24	4,0	46	-	53	-		
6-27	1:20	8	71	13	48	39	7	53	-		
	1:100	12	57	15	40	39	7	51	1,9		
	1:500	23	18	20	20	42	-	52	-		
	1:2500	27	3,6	26	-	45	-	52	-		
16-H	1:20	33	-	26	-	44	-	53	-		
	1:100	31	-	26	-	47	-	54	-		
	1:500	29	-	27	-	46	-	53	-		
	1:2500	27	3,6	27	-	48	-	54	-		
T ₂ Ab ₂	1:20	30	-	24	4,0	44	-	52	-		
	1:100	28	-	24	4,0	46	-	53	-		
	1:500	29	-	24	4,0	44	-	52	-		
	1:2500	29	-	27	-	42	-	52	-		
keine Behandlung		28		25		42		52			

a) keine Hemmung nachweisbar

b) Hybridoma-Kulturüberstand

c) gereinigter Antikörper

Tabelle 13: Zytotoxizität nach Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper TCR2

3.3 Zellvermittelte Immunantwort nach Immunisierung mit NDV

3.3.1 Reaktion nach primärer Immunisierung

Die Milzen der nach 2.5.2 immunisierten Tiere wurden acht und zehn Tage nach der Virusinokulation auf zytotoxische Aktivität untersucht. Bei jedem Ansatz wurden auch Milzzellen eines nicht immunisierten Huhnes gegen NDV-infizierte HEF getestet, wobei sich eine ^{51}Cr -Freisetzung nahe 0 % (-2,8 % bis +2,8 %) ergab; ein einziges Tier erreichte - je nach E/T-Ratio - 9,3 % bis 12,8 %. Diese Werte wurden jeweils von den bezüglich E/T-Ratio vergleichbaren Ergebnissen bei immunisierten Tieren subtrahiert. Die auf diese Weise berechneten Werte für die zytotoxische Aktivität sind in Tabelle 14 (intravenöse Verabreichung) und Tabelle 15 (Applikation über die Schleimhäute) dargestellt.

Es zeigt sich, daß durch die intravenöse Immunisierung mit NDV (Stamm La Sota) eine am achten und zehnten Tag nach Virusverabreichung nachweisbare zytotoxische Reaktion induziert werden kann, die Werte bis 13 % erreicht. Diese Reaktion ist vom Effektor-Zielzellverhältnis abhängig; hohe E/T-Ratios (200:1, 66:1) bewirken eine deutliche Lysis der Zielzellen, während die Werte bei niedriger E/T-Ratio sehr viel niedriger liegen.

Die gleichzeitige Inkubation von Effektorzellen mit nicht NDV-infizierten HEF, die bis auf eine Ausnahme bei allen Ansätzen durchgeführt wurde, ergab in keinem Fall eine nachweisbare Reaktion; die Werte lagen sowohl bei immunisierten als auch nicht immunisierten Tieren unter 0 % (-13,2 % bis +0,4 %). Abbildung 3 zeigt die zytotoxische Aktivität zweier immunisierter und eines nicht immunisierten Tieres sowohl gegen infizierte als auch nicht infizierte HEF.

Nach NDV-Immunisierung über die Schleimhäute war nur bei zwei der Versuchstiere am achten Tag eine zytotoxische Reaktion nachzuweisen.

Die Kontrolle mit nicht NDV-infizierten HEF als Zielzellen ergab, daß auch diese Reaktion nur gegen infizierte, nicht aber gegen nicht infizierte HEF gerichtet war.

Am zehnten Tag nach intranasaler und konjunktivaler Immunisierung mit verschiedenen Virusdosen konnte bei keinem der Tiere eine zytotoxische Reaktion der Milzzellen gegen NDV-infizierte HEF nachgewiesen werden.

3.3.2 Reaktion nach sekundärer Immunisierung

Nach Primärimmunisierung intranasal und konjunktival mit verschiedenen Virusdosen (2×10^4 bis 2×10^8 EID₅₀) wurde am 13. Tag mit jeweils 2×10^8 EID auf dem selben Wege reimmunisiert.

Fünf Tiere wurden am dritten, vier Tiere am fünften Tag nach der sekundären Immunisierung auf zytotoxische Aktivität untersucht. Dabei konnten keine Hinweise auf eine zytotoxische Aktivität gefunden werden.

Tage nach Inokulation	Verabreichte Virusdosis (EID ₅₀)	Spezifische Zytotoxizität		
		E/T-Ratio		
		200:1	66:1	22:1
8	1 x 10 ⁵	7,8	0,6	0,1
	1 x 10 ⁶	4,0	5,2	1,6
	1 x 10 ⁷	13,5	9,9	4,5
	1 x 10 ⁸	3,4	- 3,8	- 0,2
10	1 x 10 ³	13,1	3,2	0,1
	1 x 10 ⁴	4,3	7,2	- 0,9
	1 x 10 ⁵	8,5	8,2	1,1
	1 x 10 ⁶	5,0	12,4	- 0,2

Tabelle 14: Zytotoxizität nach primärer i.v. Immunisierung mit NDV

Tage nach Inokulation	Verabreichte Virusdosis (EID ₅₀)	Spezifische Zytotoxizität		
		E/T-Ratio		
		200:1	66:1	22:1
8	2 x 10 ⁵	- 5,7	- 8,1	6,7
	2 x 10 ⁶	4,2	4,0	19,9
	2 x 10 ⁷	8,2	7,0	10,9
10	2 x 10 ⁵	- 5,3	4,4	2,8
	2 x 10 ⁶	-11,0	- 9,7	- 2,8
	2 x 10 ⁷	- 9,1	- 5,7	- 6,3

Tabelle 15: Zytotoxizität nach primärer intranasaler und konjunktivaler Immunisierung mit NDV

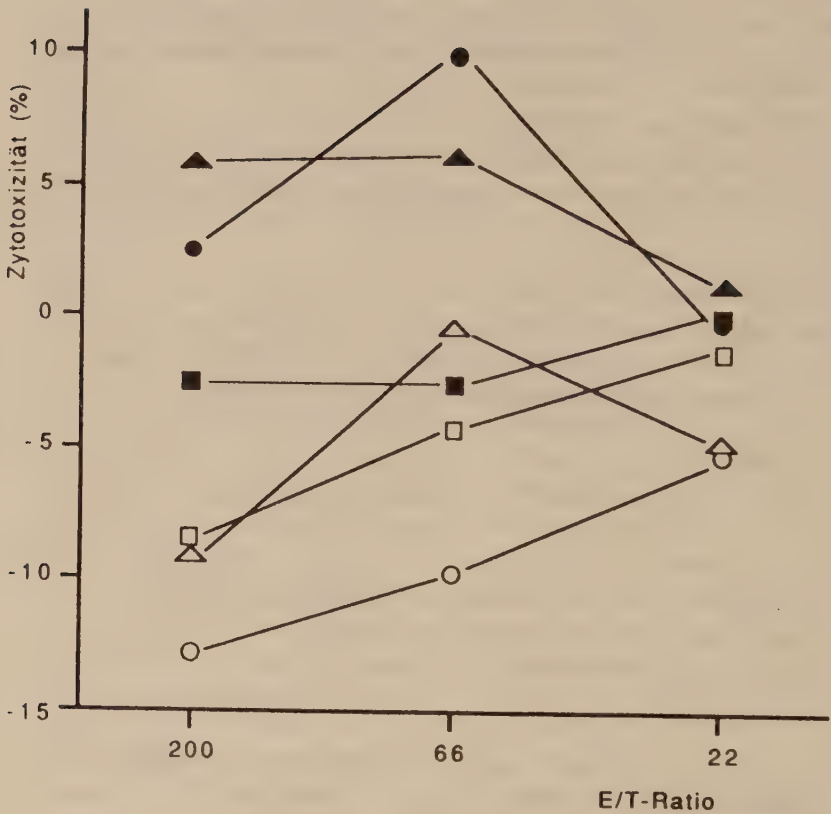


Abbildung 3: Zytotoxische Reaktion gegen NDV 10 Tage nach i. v. Immunisierung

Die Effektorzellen stammen von jeweils einem mit 1×10^6 (●, ○) und 1×10^5 EID₅₀ (▲, △) immunisierten Huhn bzw. einem nicht immunisierten Kontrolltier (■, □).

●, ▲, ■: NDV-infizierte HEF als Zielzellen
○, △, □: nicht infizierte HEF als Zielzellen

4. DISKUSSION

4.1 Zellvermittelte Immunreaktion gegen Alloantigene

Bei den Versuchen zur zellulären Immunität gegen Alloantigene ging es zunächst darum, geeignete Hühnerlinien auszuwählen, um eine möglichst starke Immunreaktion zu induzieren. NEUMANN und BACON (1986) überprüften verschiedene Stimulator-Responder-Kombinationen in der "mixed lymphocyte culture" und stellten fest, daß zwei Linien des B-Haplotyps B^2/B^2 optimal mit Lymphozyten der B-Haplotypen B^{12}/B^{12} , weniger stark auch B^5/B^6 stimuliert werden konnten. Es erschien sinnvoll, als Spender allogener Blutzellen Tiere dieser B-Haplotypen zu verwenden, um die zur Verfügung stehenden RPRL6-Hühner (B^2/B^2) zu immunisieren.

Wegen einer möglichen Graft-versus-host-Reaktion, die vermieden werden sollte, wurden zunächst nur Erythrozyten appliziert, bevor bei der letzten Injektion den bereits wiederholt immunisierten Tieren zusätzlich Lymphozyten verabreicht wurden, die neben den auch bei Erythrozyten vorkommenden B-F- und B-G-Antigenen auch B-L-Antigene enthalten (zusammenfassend: CRONE und SIMONSEN, 1987).

Um mögliche Einflüsse der humoralen Immunantwort auf die zellvermittelte Immunität auszuschalten, wurde die Mehrzahl der Versuche an neonatal cyclophosphamidbehandelten Tieren durchgeführt. Auf die zusätzliche chemische oder chirurgische Burssektomie, welche eine noch tiefgreifendere Immunsuppression verursacht (FIEDLER et al., 1977), wurde verzichtet, weil dabei schlechte Ergebnisse hinsichtlich Schlupf und Aufzucht zu befürchten waren.

Als großes Problem erwies sich die hohe Sterblichkeit der cyclophosphamidbehandelten Tiere (bis über 60 % innerhalb der ersten drei Lebensmonate), die etwa ab der achten Lebenswoche einsetzte und gleichermaßen immunisierte wie nicht immunisierte Hühner betraf; die Ausfälle bei gleichzeitig unter identischen Bedingungen gehaltenen nicht cyclophosphamidbehandelten RPRL6-Tieren waren minimal. Die pathologisch-anatomische, histologische und bakteriologische Untersuchung am Institut für Geflügelkrankheiten ergab das Vorliegen der Marekschen Krankheit; außerdem wurden bei allen untersuchten Tieren mittel- bis hochgradige Keimzahlen an verschiedenen Coli-Stämmen nachgewiesen.

Deswegen wurden die letzten Versuche mit cyclophosphamidbehandelten Tieren durchgeführt, die unmittelbar nach dem Schlupf mit einer Lebendvakzine gegen die Mareksche Krankheit geimpft worden waren und denen zusätzlich eine Tetracyclin-Vitamin-Kombination in therapeutischer Dosis oral verabreicht wurde. Bei diesen Tieren war die Mortalität vergleichsweise sehr gering. Zudem war überraschenderweise bei keinem dieser Tiere Serum-IgG oder -IgM in der Immunelektrophorese nachweisbar, was bei anderen, nur mit Cyclophosphamid behandelten Hühnern nur bei etwa 40 % der Fall war. Nachdem allerdings diese letzte Gruppe nur vierzehn Tiere umfaßte, mußte geklärt werden, ob die gleichzeitige neonatale Verabreichung von Cyclophosphamid und die aktive Schutzimpfung mit Putenherpes-Lebendimpfstoff, welche offensichtlich trotz Immunsuppression erfolgreich war, regelmäßig zu Agammaglobulinämie führt.

⁵¹Cr-Chrom-markierte Erythrozyten wurden in ähnlichen Versuchen auch von PALLADINO et al. (1980), CHI et al. (1981 a) und CHI und THORBECKE (1981 b) als Zielzellen im ⁵¹Cr-Release-Assay benutzt; sie scheinen für diesen Zweck hervorragend geeignet zu sein.

Die ⁵¹Cr-Freisetzung in Anwesenheit von Milzzellen nicht immunisierter Hühner lag etwa so hoch wie die spontane Freisetzung. Aus diesem Grund wurde auf die regelmäßige Verwendung von Kontroll-Lymphozyten nicht immunisierter Tiere verzichtet.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente bestätigen, daß sowohl immunologisch intakte als auch agammaglobulinämische Hühner in der Lage sind, eine beträchtliche zellvermittelte zytotoxische Aktivität gegen Alloantigene zu entwickeln.

Diese Aktivität ist spezifisch gegen das auslösende Antigen gerichtet und nimmt mit fallendem Effektor-Ziellverhältnis ab. Bei mehreren Ansätzen zeigt sich zwar bei hoher E/T-Ratio (100:1) eine deutlich geringere Zytotoxizität als bei 50:1, was auch von anderen Autoren (PALLADINO et al., 1980) beobachtet wurde; dies dürfte an der hohen Zelldichte ($5 \times 10^7/\text{ml}$) liegen, welche zur sterischen Hemmung der Effektorzellen führt.

Durch Fraktionieren der Effektorzellen wurde die für die Zytotoxizität verantwortliche Zellpopulation charakterisiert.

Die Adsorption von B-Lymphozyten an mit Antikörpern beschichtete Petrischalen hatte keinen Einfluß auf die Zytotoxizität; sie war in der effluenten Fraktion vollständig erhalten.

Die Elimination adhärrierender und phagozytischer Zellen (Plastik-Adhärenz, Karbonyleisen und Magnet) bewirkte bei Milzzellen immunologisch intakter Tiere eine deutliche Reduktion der Aktivität, während es bei agammaglobulinämischen Tieren eher zu einer geringgradigen Steigerung derselben kam.

Die häufig zur Eliminierung von T-Lymphozyten gebrauchte ATS-Komplement-Behandlung war wegen der auftretenden Zellagglutination schwierig auszuwerten. Schon durch die Inkubation mit ATS allein wurde die zytotoxische Aktivität von Effektorzellen agammaglobulinämischer Tiere weitgehend gehemmt, was bei immunologisch intakten Hühnern nur in einem geringen Ausmaß der Fall war. Behandlung mit ATS und Komplement führte zu keiner vermehrten Inhibition der Aktivität. Offensichtlich reagierte das ATS spezifisch mit den T-Zellen, so daß diese durch Agglutination, welche bei Thymus- und Milzzellen, nicht aber Bursazellen beobachtet wurde, in ihrer Aktivität gehemmt wurden. Ein unspezifischer Effekt durch diese Agglutination ist unwahrscheinlich, allenfalls minimal, denn dann müßten Effektorzellen sowohl von agammaglobulinämischen als auch immunologisch intakten Tieren gleichermaßen in ihrer Aktivität gehemmt werden.

Die zytotoxische Aktivität humaner T-Lymphozyten kann durch monoklonale Antikörper (mab) gehemmt werden, welche den T-Zellrezeptor (MEUER et al., 1982) bzw. das eng damit assoziierte T3-Antigen (LANDEGREN et al., 1982; TSOUKAS et al., 1982) erkennen. Es konnte gezeigt werden, daß diese Hemmung in einer frühen Phase der zytotoxischen Reaktion stattfindet, jedoch die Formation von CTL-Ziell Zellkomplexen nicht verhindert wird, was auf eine primäre unspezifische Adhäsion von CTL und Zielzellen hinweist, welche der Antigenerkennung durch spezifische Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und Antigen vorausgeht (SPITS et al., 1986). Offensichtlich greifen T-Zellrezeptor- bzw.

T3-Antigen-spezifische mabs in diese zuletzt geschilderte Phase der Antigenerkennung ein und verhindern die spezifische Bindung zwischen T-Zellrezeptor und Antigen, nicht aber die primäre unspezifische Adhäsion.

Der am hiesigen Labor hergestellte und charakterisierte mab TCR2 (CIHAK et al., zur Veröffentlichung eingesandt; CHEN et al., zur Veröffentlichung eingesandt) reagiert mit dem α/β -T-Zellrezeptor beim Huhn. In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, daß mit diesem T-zell-rezeptorspezifischen mab die Hemmung der Zytolyse durch Milzzellen von agammaglobulinämischen Tieren gelingt. Die Hemmung ist spezifisch für den Antikörper und - abhängig von der Verdünnung des mab's - nur bei Ansätzen mit dem TCR2-Antikörper, nicht aber bei den Kontrollantikörpern nachweisbar. Die Blockierung der Zytolyse wird wahrscheinlich analog wie im humanen System durch Besetzen des T-Zellrezeptors und damit durch Verhinderung der Bindung des Antigens an den T-Zellrezeptor bewirkt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die nachgewiesene zellvermittelte Immunreaktion gegen Alloantigene bei agammaglobulinämischen Tieren im Wesentlichen auf der Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten beruht.

Zwar ist die Hemmung der zytotoxischen Aktivität durch den mab TCR2 nicht vollständig (nur bis etwa 70 %); dies bedeutet jedoch nicht, daß andere Zellen als T-Lymphozyten an der zytotoxischen Aktivität der Milzzellen agammaglobulinämischer Tiere beteiligt sein müssen.

Einerseits kann dies an der Konzentration des Antikörpers liegen, die möglicherweise nicht ausreichte, um maximale Hemmung zu bewirken. Zum anderen könnte auch die Tatsache eine Rolle spielen, daß der mab TCR2 selektiv den α/β -T-Zellrezeptor erkennt, der nicht an allen T-Zellen exprimiert wird. Eine beträchtliche Anzahl von Hühner-T-Zellen (in der Milz 30 %) exprimiert einen anderen, den γ/δ -T-

Zellrezeptor (SOWDER et al., im Druck); es ist möglich, daß diese γ/δ -T-Lymphozyten auch CTL-Aktivität entwickeln können, die nicht durch den α/β -spezifischen mab TCR2 inhibiert werden könnte.

Daß andere Zellpopulationen entscheidend an der zytotoxischen Reaktion beteiligt sind, ist äußerst unwahrscheinlich.

ADCC dürfte als Mechanismus ausscheiden, nachdem in den Seren der Versuchstiere keine Immunglobuline (IgG und IgM) nachzuweisen waren und auch die Adsorption an mit Anti-Huhn-IgG-beschichteten Petrischalen keine Minderung der Zytotoxizität bewirken konnte.

Es ist nicht auszuschließen, daß NK-Aktivität eine gewisse Rolle spielen könnte, nachdem weder durch TCR2 noch durch ATS (hier allerdings bis 98 %) eine vollständige Inhibition gelang. NK-Zellen sind nicht adhärierend und nicht phagozytierend (LAM und LINNA, 1980) und nicht durch monospezifische Seren gegen T- oder B-Zellen identifizierbar (SHARMA und OKAZAKI, 1981). Andererseits wäre dann auch bei nicht immunisierten Tieren wenigstens eine geringe Aktivität zu erwarten.

Bei immunologisch intakten Hühnern scheinen zytotoxische T-Lymphozyten als Effektorzellen eine sehr viel geringere Bedeutung zu besitzen. Die geringfügige Reduzierung der Aktivität durch ATS und TCR2 (in einer Endverdünnung von 1:20) weist allerdings darauf hin, daß diese einen Anteil an der zytotoxischen Reaktion haben dürften.

NK-Zellen dürften aus den oben angeführten Gründen auch hier als Effektorzellen kaum eine Rolle spielen.

Die Aktivität beruhte bei den nicht cyclophosphamidbehandelten Tieren im wesentlichen auf adhärierenden und phagozytierenden Zellen. PALLADINO et al. (1980), die ähnliche Ergebnisse bei immunologisch intakten Tieren erzielten, führen dies auf "aktivierte Makrophagen" (HIBBS, 1976) zurück, welche auch beim Huhn demonstriert werden konnten (PALLADINO und THORBECKE, 1978 a - c). Die Spezifität der zytolytischen Reaktion könnte durch Interaktionen Makrophagen - Lymphozyten (EVANS und ALEXANDER, 1970; PALLADINO und THORBECKE, 1978 b) erklärt werden.

Ein anderer möglicher Effektormechanismus wäre die von RONNLUND und LINNA (1980) und CHI und THORBECKE (1981 b) beim Huhn beschriebene ADCC gegen Alloantigene. Allerdings ist hierbei die Anwesenheit spezifischer humoraler Antikörper notwendig, die bei der beschriebenen Behandlung der Effektorzellen kaum in ausreichendem Maße vorhanden sein dürften. Auch die nur unwesentliche Reduzierung der Aktivität nach Adsorption der B-Lymphozyten an mit Anti-Huhn-IgG beschichtete Plastikoberflächen, welche eine fast vollständige Depletion oberflächenimmunglobulintragender Zellen bewirkt (CIHAK et al., zur Veröffentlichung eingesandt), spricht nicht für eine Rolle der ADCC in diesem Zusammenhang.

Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich weitgehend mit den Resultaten von PALLADINO et al. (1980) und CHI et al. (1981 a). Allerdings fanden diese auch bei agammaglobulinämischen Tieren eine deutliche Minderung der zytotoxischen Aktivität nach Adhärenz an Nylonwolle oder Plastikoberflächen, die jedoch bedeutend weniger ausgeprägt war als bei immunologisch intakten Tieren; dies konnte in den vorliegenden Untersuchungen nicht festgestellt werden.

RONNLUND und LINNA (1980) fanden in ähnlichen Versuchen eine adhärente, nicht durch ATS, ABS oder Karbonyleisen reduzierbare Zellpopulation, die für die zytotoxische Reaktion verantwortlich ist und deren Aktivität durch Anti-Huhn-IgG inhibiert wird. Bei neonatal bursektomierten Tieren konnte keine zellvermittelte Immunantwort gegen Alloantigene nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird von RONNLUND und LINNA ADCC als Effektor-mechanismus verantwortlich gemacht.

4.2 Zellvermittelte Immunreaktion gegen NDV

Es war ursprünglich angestrebt, ein System zu entwickeln, in dem zellvermittelte Immunität gegen virale Antigene hervorgerufen und nachgewiesen werden sollte, da hierzu bei Vögeln im Gegensatz zu Säugern nur wenige Angaben in der Literatur zu finden sind.

Das Newcastle Disease Virus wurde ausgewählt, weil hier ein apathogener Lebendimpfstoff zur Verfügung steht, das Virus sich problemlos in Zellkulturen züchten läßt, und weil im Tierbestand des Instituts kein serologisch nachweisbarer Kontakt mit dem Virus in virulenter oder attenuierter Form (Impfung) gegeben war.

Zunächst mußte ein Nachweissystem für zellvermittelte Zytotoxizität gefunden werden. Hierzu erschien es am sinnvollsten, den zu diesem Zweck gebräuchlichen ^{51}Cr -Release-Assay heranzuziehen, für den als Zielzellen lebende Zellen gebraucht werden, welche das NDV-Antigen exprimieren. Es war naheliegend, NDV-infizierte syn-genetische Hühnerembryofibroblasten als Zielzellen zu verwenden. Eine Schwierigkeit dabei war, daß NDV sich in Zellkulturen mit einem zytopathischen Effekt vermehrt (ROLLE und MAYR, 1984), so daß die NDV-infizierten HEF sehr empfindlich sind. Dies bestätigte sich in den Vorversuchen, wo höhere Virusdosen zu einer bedeutend

höheren spontanen Freisetzung führten; auch der zeitliche Ablauf von der Zellkultur-Infizierung bis zum Ansatz im ^{51}Cr -Release-Assay mußte sehr genau eingehalten werden. Trotzdem scheint mit dem beschriebenen System eine spezifische Messung der Zelllysis möglich zu sein, wenngleich eine spontane Freisetzung von etwa 30 % Anlaß zur äußerst kritischen Interpretation der Ergebnisse geben sollte.

^{51}Cr -Release-Assays zur Zytotoxizitätsmessung gegenüber viralen Antigenen im aviären System wurden auch von anderen Autoren benutzt: CANNON und RUSSELL (zur Veröffentlichung eingewandt) verwenden infizierte phythämagglutininaktivierte Blastzellen bzw. peritoneale Makrophagen vom Huhn als Zielzellen zum Nachweis zytotoxisch aktiver Zellen gegenüber NDV. Auch hier mußte eine spontane Freisetzung von 42 % hingenommen werden. Zytotoxizität gegen virale Antigene des Marekvirus wurde mittels ^{51}Cr -Release-Assay von KODAMA et al. (1979) nachgewiesen, wobei infizierte Hühnernierenzellen aus Zellkulturen als Zielzellen dienten. Die spontane Freisetzung betrug hier 25 % bis 43 %, teilweise auch bis zu 50 %.

Nach primärer Immunisierung mit NDV konnte zumindest nach i.v. Verabreichung eine zytotoxische Reaktion festgestellt werden, deren meßbare Werte jedoch relativ niedrig (maximal etwa 13 %) lagen und zudem große individuelle Schwankungen aufwiesen; einzelne Tiere reagierten nur minimal oder gar nicht erfaßbar. Nicht infizierte HEF wurden in keinem Fall lysiert; demnach könnte die Aktivität der Milzzellen spezifisch gegen das NDV-Antigen gerichtet sein.

Die Immunisierung über die Schleimhäute wurde durchgeführt, um dem natürlichen Infektionsmodus nahezukommen und eine primäre Virusvermehrung an der Eintrittspforte zu ermöglichen. Eine verstärkte zellvermittelte Immunantwort konnte hierbei aber nicht nachgewiesen werden.

Als etwas problematisch erwies sich der Umgang mit NDV-infizierten Tieren oder Material. Obwohl der verwendete Stamm La Sota nicht pathogen für Hühner ist, sollte auf jeden Fall eine versehentliche Infizierung des Bestands mit dem vermehrungsfähigen Virus vermieden werden.

Angesichts dieser Problematik und der sehr geringen zytotoxischen Aktivität wurde auf eine Charakterisierung der für die Zytotoxizität verantwortlichen Effektorzellpopulation verzichtet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zytotoxische Aktivität von Milzzellen beim Huhn wurde durch Immunisierung in vivo hervorgerufen und mittels eines ^{51}Cr -Release-Assay nachgewiesen.

Nach primärer i.v. Immunisierung von RPRL6- und UM B19-Hühnern mit NDV (Stamm La Sota) konnte eine schwache zytotoxische Reaktion der Milzzellen gegen syngene, mit NDV infizierte HEF, nicht aber gegen nicht infizierte HEF demonstriert werden.

Nach wiederholter, mindestens dreimaliger i. v. Immunisierung von entweder immunologisch intakten oder agammaglobulinämischen RPRL6-Hühnern mit allogenen Blutzellen (B12 bzw. B5) zeigten die Milzzellen immunisierter Tiere hohe zytotoxische Aktivität gegen B12- bzw. B5-Erythrozyten.

Diese Aktivität verschwand bei Milzzellen agammaglobulinämischer Tiere weitgehend nach Behandlung mit ATS und ließ sich durch Inkubation mit dem T-zellrezeptorspezifischen mab TCR2 deutlich reduzieren. Die Elimination adhärrierender und phagozytischer Zellen sowie von B-Lymphozyten hatte keinen Einfluß auf die Zytotoxizität.

Bei Effektorzellen normogammaglobulinämischer Hühner hatten ATS und TCR2 nur geringen Einfluß auf die zytotoxische Aktivität, während diese durch Ausschaltung adhärrierender und phagozytischer Zellen hochgradig gehemmt wurde; die Elimination von B-Zellen hatte keine Hemmung der Reaktion zur Folge.

Daraus wird geschlossen, daß bei den agammaglobulinämischen Hühnern im Wesentlichen zytotoxische T-Lymphozyten für die zellvermittelte Immunreaktion gegen Alloantigene verantwortlich sind, während bei den immunologisch intakten Tieren anscheinend Makrophagen die entscheidende Rolle spielen.

6.

SUMMARY

INDUCTION OF CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES IN THE CHICKEN

Cytotoxic activity of chicken spleen cells was induced by immunization in vivo and measured by a ^{51}Cr release assay.

After primary i. v. immunization of RPRL6- and UM B19-chickens with NDV (La Sota strain), a weak cytotoxic reaction could be demonstrated against syngeneic chicken embryo fibroblasts infected with NDV, but not against non-NDV-infected chicken embryo fibroblasts.

After repeated, at least three i. v. immunizations of either immunologically intact or agammaglobulinemic RPRL6-chickens with allogeneic blood cells (B12 or B5), their spleen cells exhibited high cytotoxic levels against B12- respectively B5-erythrocytes.

In spleen cells of agammaglobulinemic animals this activity disappeared to a great extent after ATS treatment and could markedly be reduced by incubation with the mab TCR2. Elimination neither of adherent and phagocytic cells nor of B Lymphocytes had any influence on cytotoxicity.

In effector cells of normogammaglobulinemic chickens ATS and TCR2 only caused weak inhibition of cytotoxic activity, while removal of adherent and phagocytic cells inhibited this activity to a high degree; elimination of B cells did not influence cytotoxicity.

It is concluded that in agammaglobulinemic chickens essentially cytotoxic T lymphocytes are responsible for cell-mediated immunity to alloantigens, while in immunologically intact animals macrophages apparently play the most important role.

7. LITERATURVERZEICHNIS

BOYD, R. L. und H. A. WARD, 1978

Lymphoid antigenic determinants of the chicken.
Cellular representation and tissue localization.

Immunology, 34, 9 - 17

BÖYUM, A., 1968

Isolation of mononuclear cells and granulocytes
from human blood.

Scand. J. clin.

Lab. Invest., 21 (suppl. 97), 77 - 89

BRUNNER, K. T., H. D. ENGERS und J.-C. CEROTTINI, 1976

The ^{51}Cr release assay as use for the quantitative
measurement of cell-mediated cytotoxicity in vitro.

In: In vitro methods in cell-mediated and tumor
immunity, 423 - 428, edited by B. A. Bloom
and J. R. David

Verlag: Academic Press, New York,
San Francisco, London

CANNON, M. J. und P. H. RUSSELL

Secondary in-vitro stimulation of specific
cytotoxic cells to Newcastle disease virus in
chickens.

Zur Veröffentlichung eingesandt

CHEN, C.-L. H., J. CIHAK, U. LÖSCH, M. D. COOPER

Differential expression of two T cell receptors,
TCR1 and TCR2, on chicken lymphocytes.

Zur Veröffentlichung eingesandt

CHI, D. S., N. BLYZNAK, A. KIMURA,
M. A. PALLADINO und G. J. THORBECKE, 1981 a

Cytotoxicity to allogeneic cells in the chicken.
II. Specific cytotoxic T cells and macrophages
in the spleens of agammaglobulinemic and normal
alloimmune chickens.

Cell. Immunol., 64, 246 - 257

CHI, D. S. und G. J. THORBECKE, 1981 b

Cytotoxicity to allogenic cells in the chicken.
III. Antibody-dependent cell-mediated
cytotoxicity in normal and agammaglobulinemic
chickens.

Cell. Immunol., 64, 258 - 265

CIHAK, J., H. W. L. ZIEGLER-HEITBROCK, J. TRAINER,
I. SCHRANNER, M. MERKENSCHLAGER und U. LÖSCH

Characterization and functional properties of a
novel monoclonal antibody which identifies a
T cell receptor in chickens.

Zur Veröffentlichung eingesandt

CRONE, M. und M. SIMONSEN, 1987

Avian major histocompatibility complex.

In: Avian immunology: Basis and practice, Volume
II, 25 - 41, edited by A. Toivanen and
P. Toivanen
Verlag: CRC Press, Inc., Boca Raton,
Florida

EVANS, R. und P. ALEXANDER, 1970

Cooperation of immune lymphoid cells with
macrophages in tumour immunity.

Nature (London), 228, 620 - 622

FIEDLER, H., U. LÖSCH, D. HERLYN
und G. HOFFMANN-FEZER, 1977

Die Auswirkungen neonataler Cyclophosphamid-
verabreichung (Cy), chirurgischer Bursaektomie
(Bx) und kombinierter Behandlung (Cy + Bx)
auf die immunologische Leistungsfähigkeit von
Küken in verschiedenen Altersstufen.

Zbl. Vet. Med. B, 24, 609 - 622

FLEISCHER, B., 1980

Effector cells in avian spontaneous and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.

J. Immunol., 125, 1161 - 1166

GOLSTEIN, P. und H. BLOMGREN, 1973

Further evidence for autonomy of T cells mediating specific in vitro cytotoxicity: efficiency of very small amounts of highly purified T cells.

Cell. Immunol., 9, 127 - 141

GRABSTEIN, K., 1980

Chromium release assay

In: Selected methods in cellular immunology, 128 - 137, edited by B. M. Mishell and S. M. Shiigi
Verlag: W. H. Freeman and Company,
San Francisco

HIBBS, J. B., 1976

Role of activated macrophages in nonspecific resistance to neoplasia.

J. Reticuloendothel. Soc., 20, 223 - 231

ISAKOVIC, K., K. MITROVIC, B. M. MARKOVIC,
M. RAJCEVIC, und B. D. JANKOVIC, 1975

Preparation of specific anti-thymocyte and anti-bursocyte sera in rabbits.

J. Immunol. Methods, 7, 359 - 370

IVANYI, J. und P. M. LYDYARD, 1972

Delineation of chicken lymphocyte populations by specific anti-thymus and anti-bursa sera.

Cell. Immunol., 5, 180 - 189

KODAMA, H., C. SUGIMOTO, F. INAGE und T. MIKAMI, 1979

Anti-viral immunity against Marek's disease virus infected chicken kidney cells.

Avian Pathol., 8, 33 - 44

KURTH, R. und H. BAUER, 1972

Cell-surface antigens induced by avian RNA tumor viruses: detection by a cytotoxic microassay.

Virology, 47, 426 - 433

LAM, K. M. und T. J. LINNA, 1980

Transfer of natural resistance to Marek's disease (JMV) with nonimmune spleen cells.

II. Further characterization of protecting cell population.

J. Immunol., 125, 715 - 718

LANDEGREN, U., U. RAMSTEDT, I. AXBERG, M. ULLBERG, M. JONDAL und H. WIGZELL, 1982

Selective inhibition of human T cell cytotoxicity at levels of target recognition or initiation of lysis by monoclonal OKT3 and Leu-2a antibodies.

J. Exp. Med., 155, 1579 - 1584

LANIER, L. L. und J. H. PHILLIPS, 1986

Evidence of three types of human cytotoxic lymphocyte.

Immunology today, 7, 132 - 134

LFE, K.-C., 1980

Carbonyl iron powder.

In: Selected methods in cellular immunology, 179 - 182, edited by B. M. Mishell and S. M. Shiiqi

Verlag: W. H. Freeman and Company, San Francisco

MACCUBBIN, D. L. und L. W. SCHIERMANN, 1986

MHC-restricted cytotoxic response of chicken T cells: expression, augmentation, and clonal characterization.

J. Immunol., 136, 12 - 16

MAGE, M. A., L. L. MCHUGH und T. L. ROTHSTEIN, 1977

Mouse lymphocytes with and without surface immunoglobulin: preparative scale separation in polystyrene tissue culture dishes coated with specifically purified anti-immunoglobulin.

J. Immunol. Methods, 15, 47 - 56

MAYR, A., P. A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN, 1974

Virologische Arbeitsmethoden.
Band I: Zellkulturen - Bebrütete Hühnereier - Versuchstiere

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

MCGRAIL, T. P., W. M. COLLINS, W. R. DUNLOP und R. M. ZSIGRAY, 1978

Lymphocytotoxicity of chickens bearing Rous sarcomas.

Poult. Sci., 57, 90 - 94

MEUER, S. C., R. E. HUSSEY, J. C. HODGDON, T. HERCEND, S. F. SCHLOSSMAN und E. L. REINHERZ, 1982

Surface structures involved in target recognition by human cytotoxic T lymphocytes.

Science, 218, 471 - 473

MIZUOCHI, T., S. ONO, T. R. MALEK und A. SINGER, 1986

Characterization of two distinct primary T cell populations that secrete interleukin 2 upon recognition of class I or class II major histocompatibility antigens.

J. Exp. Med., 163, 603 - 619

NEUMANN, U. und L. D. BACON, 1986

Die "Mixed Lymphocyte Culture (MLC)":
Versuche zur Optimierung der Kulturbedingungen
im aviären System.

Dtsch. tierärztl. Wschr., 93, 49 - 51

PALLADINO, M. A. und G. J. THORBECKE, 1978 a

Immunity to transplantable carcinogen-induced
fibrosarcomas in B2/B2-chickens.

I. Use of bacterial adjuvants in induction of
immunity demonstrated in Winn tests.

Cell. Immunol., 38, 336 - 349

PALLADINO, M. A. und G. J. THORBECKE, 1978 b

Immunity to transplantable carcinogene-induced
fibrosarcomas in B2/B2-chickens.

II. Macrophage dependency of adoptive T cell
mediated tumor immunity.

Cell. Immunol., 38, 350 - 364

PALLADINO, M. A. und G. J. THORBECKE, 1978 c

Immunity to transplantable carcinogen-induced
fibrosarcomas in B2/B2-chickens.

III. Tumor growth inhibition by local delayed
hypersensitivity reactions to unrelated antigens.

Eur. J. Immunol., 8, 257 - 262

PALLADINO, M. A., D. S. CHI, N. BLYZNAK,
A. M. PAOLINO und G. J. THORBECKE, 1980

Cytotoxicity to allogeneic cells in the chicken.

I. Role of macrophages in the cytotoxic effect
on ⁵¹Cr-labelled red blood cells by immune spleen
cells.

Dev. Comp. Immunol., 4, 309 - 322

POWELL, P. C. und J. G. ROWELL, 1977

Dissociation of antiviral and antitumor immunity
in resistance to Marek's disease

J. Natl. Cancer Inst., 59, 919 - 924

ROLLE, M. und A. MAYR, 1984

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und
Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen und Agrar-
wissenschaftler: Lehrbuch für Praxis und
Studium.

5., neu bearb. u. erw. Auflage

Newcastle Disease (ND), S. 500 - 505

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart

RONNLUND, R. D. und T. J. LINNA, 1978

An assay for cell-mediated cytolysis in the
chicken.

Fed. Proc., 37, 1683

RONNLUND, R. D. und T. J. LINNA, 1980

Studies on the mechanism of cell-mediated
cytolysis in vitro in a chicken model.

Fed. Proc., 39, 924

SCHAT, K. A. und K. K. MURTHY, 1980

In vitro cytotoxicity against Marek's disease
lymphoblastoid cell lines after enzymatic
removal of Marek's disease tumor-associated
surface antigen.

J. Virol., 34, 130 - 135

SCHEIDEGGER, J. J., 1955

Une microméthode de l'immune-électrophorèse.

Int. Arch. Allergy, 7, 103 - 110

SCHRANNER, I. und U. LÖSCH, 1986

Immunological identification of avian monomeric
and polymeric immunoglobulin M and immuno-
globulin A after fractionation on sodium dodecyl-
sulfate pore gradient polyacrylamid gels.

Poult. Sci., 65, 360 - 368

SHARMA, J. M., R. L. WITTER und B. D. COULSON, 1978

Development of cell-mediated immunity to Marek's disease tumor cells in chickens inoculated with Marek's disease vaccines.

J. Natl. Cancer Inst., 61, 1273 - 1280

SHARMA, J. M. und B. D. COULSON, 1979

Presence of natural killer cells in specific-pathogen-free chickens.

J. Natl. Cancer Inst., 63, 527 - 531

SHARMA, J. M. und W. OKAZAKI, 1981

Natural killer cell activity in chickens: target cell analysis and effect of anti-thymocyte serum on effector cells.

Infect. Immun., 31, 1078 - 1085

SOWDER, J. T., C.-L. H. CHEN, L. L. AGER,
M. M. CHAN und M. D. COOPER

Ontogeny of a subpopulation of avian T cells that resemble mammalian $\gamma\delta$ cells.

J. Exp. Med., im Druck

SPITS, H., W. VAN SCHOOTEN, H. KEIZER,
G. VAN SEVENTER, M. VAN DE RIJN, C. TERHORST
und J. E. DE VRIES, 1986

Alloantigen recognition is preceded by nonspecific adhesion of cytotoxic T cells and target cells.

Science, 232, 403 - 405

TSOUKAS, C. D., D. A. CARSON, S. FONG,
J. H. VAUGHAN, 1982

Molecular interactions in human T cell-mediated cytotoxicity to EBV.

II. Monoclonal antibody OKT3 inhibits a post-killer-target recognition/adhesion step.

J. Immunol., 129, 1421 - 1425

WICK, G., B. ALBINI und F. MILGROM, 1973

Antigenic surface determinants of chicken lymphoid cells.

I. Serologic properties of anti-bursa and anti-thymus sera.

Clin. exp. Immunol., 15, 237 - 249

WYSOCKI, L. J. und V. L. SATO, 1978

"Panning" for lymphocytes: A method for cell selection.

Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 2844 - 2848

Für den am Institut zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz danke ich Herrn Professor Dr. M. Merckenschlager und Herrn Professor Dr. H. Zucker.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. U. Lösch für die Überlassung des Themas und für jederzeit gern gewährten Rat und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. J. Cihak für die hilfreiche Einarbeitung und die vorbildliche Betreuung wie für die anregende und fruchtbare Diskussion, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Besonders hervorheben möchte ich die persönliche und freundschaftliche Atmosphäre im Labor Lösch; allen Mitarbeitern und Doktoranden, insbesondere Frau L. Mantel, Frau M. Schulz und Frau F. Pischetsrieder, sei an dieser Stelle herzlich für die stete Hilfsbereitschaft gedankt.

Herrn Professor Dr. G. Wick, Innsbruck, und Herrn Dr. W. Hartmann, Celle, danke ich für die freundliche Überlassung der Spendertiere beziehungsweise Brutetier.

Schließlich möchte ich auch Herrn Professor Dr. J. Kösters, Institut für Geflügelkrankheiten, meinen Dank aussprechen für die durchgeführten pathologisch-anatomischen Untersuchungen, sowie Frau Dr. E. Weßling, Tiergesundheitsdienst Grub, für die serologischen Untersuchungen und die Übermittlung des Anti-NDV-Konjugats.

LEBENS LAUF

22. Juni 1957 geboren in Hausham als Sohn von
Josef und Katharina Trainer, geb. Mayerbacher
- 1963 - 1967 Besuch der Volksschule Neuhaus,
Gemeinde Schliersee
- 1967 - 1976 Besuch des Staatlichen Gymnasiums Miesbach
25. Juni 1976 Allgemeine Hochschulreife
- 1976 - 1981 Studium der Tiermedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München
26. November 1981 Staatsexamen
18. Januar 1982 Approbation
- seit 1982 Tätigkeit als Praxisvertreter
- seit Februar 1986 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am
Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

